

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FUNCIONAL DE
LA TETRASPANINA CD9 CON LA INTEGRINA
LFA-1 EN LA SUPERFICIE LEUCOCITARIA**

Raquel Reyes Manzananas

Madrid, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FUNCIONAL DE LA
TETRASPANINA CD9 CON LA INTEGRINA LFA-1 EN
LA SUPERFICIE LEUCOCITARIA**

Memoria para optar al grado de Doctor en Genética y Biología Celular,
presentada por:

Raquel Reyes Manzananas

Licenciada en Biología

Director de la Tesis

Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez

Tutor de la Tesis

Dr. José Manuel Sierra Pérez

Universidad Autónoma de Madrid

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haber sido realizado sin la ayuda de muchas personas, tanto a nivel científico como personal. De todos he aprendido algo y quiero agradecer vuestra ayuda.

Este camino comenzó hace unos cuantos años gracias a mi Tutor, José Manuel, al que le debo más que el haberme dado la oportunidad de empezar este camino, porque sin sus consejos y sin su ayuda no hubiese seguido en el mundo científico. Muchas gracias por confiar en mí y por tu apoyo cuando más lo necesitaba.

Carlos, muchísimas gracias por dejarme formar parte de tu laboratorio y enseñarme que la ciencia es más que hacer experimentos. Gracias por tu paciencia, por ayudarme a resolver los problemas que han ido surgiendo, por tus clases de inglés, de botánica, de física... y por tus charlas que me han enriquecido mucho.

Gracias a mis antiguos compañeros del laboratorio 107: María, Juan, José y Raquel por vuestro apoyo. Siempre estuvisteis ahí cuando os necesitaba, vuestras risas siempre me ayudaban a verlo todo de una forma más positiva.

De mis compañeros del 125 sólo puedo decir cosas maravillosas. Muchas gracias a todos por enseñarme a que la ciencia es mucho mejor cuando se colabora entre todos. Álvaro, gracias por enseñarme tanto y por estar ahí siempre que te necesité. Irene, gracias por tu enorme ayuda en el laboratorio y por tu alegría contagiosa. Te echamos mucho de menos cuando te fuiste y siempre estamos esperando tu próxima visita. Grace, gracias por hacerme sentir tan bien cuando llegué al laboratorio. Lorena, gracias por todas tus sugerencias y tus consejos. César y Marian, gracias por ser tan buenos compañeros. Nouf, muchas gracias por tu ayuda en el laboratorio y por enseñarme a ver las cosas desde otro punto de vista. Bea, tu ayuda ha sido indispensable este último año, muchas gracias por ayudarnos a terminar el artículo, pero también muchas gracias por ser tan buena compañera. Yes, reina, empezaste siendo una muy buena compañera, pero has acabado siendo una gran amiga. Hemos aprendido tanto juntas... Tu energía y tu entusiasmo por la ciencia se contagian. Gracias por ayudarme en todo, por escucharme y por hacerme sentir en el laboratorio como en casa. En resumen, gracias por estar ahí.

Gracias a mis “vecinos” Ruth, Javi y Atocha, siempre recordaré nuestras comidas en el CBM. Muchas gracias por hacerme reír cuando más lo necesitaba, por vuestro apoyo y vuestra amistad.

Compañeras del 126, Gema, Elena, Ana, Nuria e Irene, muchas gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado. Raquel y Almudena, nos ha tocado vivir juntas la etapa de escritura de la tesis. Muchas gracias a las dos por vuestra ayuda y, sobre todo, por ser tan buenas amigas.

Juan, muchas gracias por tu ayuda y por tus comentarios en los seminarios que siempre han ayudado a mejorar mi trabajo.

Jorge, muchas gracias por tus consejos y por los ratos de café/coca-cola que me han ayudado siempre a despejarme. Te vamos a echar de menos en el CBM.

Gracias al grupo de Manolo López-Cabrera: Pilar, María-Luisa, Angy, Vicente y Adrián, por permitirnos colaborar con vosotros y enseñarnos una parte más clínica de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias Esther y Mymó porque vuestras ideas y sugerencias han sido indispensables en mi trabajo. Zoraida, Henar y Soraya, muchas gracias por ayudarme cuando lo he necesitado.

Quiero destacar la ayuda que siempre he recibido de todos los servicios del CBM. Gracias a Paco y al servicio de instrumentación que siempre nos han ayudado cuando algo se rompía. A Berta y a Silvia, no sólo por vuestra ayuda con la citometría, sino también por ser siempre tan amables. A Carlos, Vero, Ángeles, Maite y Carmen de microscopía, por ayudarme con la obtención de imágenes y con la cuantificación, pero también por vuestras charlas que siempre hacen que las horas en el microscopio pasen más rápido.

También quiero dar las gracias al Departamento de Biología de la UAM, sobre todo a la unidad de genética, por haberme dejado formar parte de este área y por permitirme ayudar en tantas asignaturas, me habéis enseñado mucho.

A mis compañeras de la uni: Blanca, Sofi, Leti, Vir, Esther, Bea, Ana y María, muchas gracias por compartir todos estos años conmigo. Hemos vivido muchas cosas juntas y sé que siempre puedo contar con vosotras.

Finalmente, el mayor de mis agradecimientos va para mi familia. Muchas gracias a mis tíos, a mis primos, a mis suegros y a mis cuñados por todo vuestro apoyo y vuestro ánimo durante esta larga etapa. Gracias a mis abuelos por vuestro gran ejemplo y por vuestro cariño incondicional, siempre os llevo conmigo. Yaya, tu fuerza es increíble, muchísimas gracias por cuidarme como a una hija y por todo tu cariño. Hay un proverbio oriental que dice: “Gobierna tu casa y sabrás cuánto cuesta la leña y el arroz; cría a tus hijos, y sabrás cuánto debes a tus padres”, pues eso papás, que os debo mucho. Siempre habéis estado ahí ayudándome en todo lo que habéis podido y dándome todo vuestro apoyo y amor. Nada de esto hubiese sido posible sin vuestra ayuda, mil gracias. Tates, desde siempre me habéis dado todo, me habéis apoyado y ayudado cada vez que he necesitado algo. Muchas gracias por ser como sois. Sergio, acabas de llegar pero tu sonrisa es la mayor de mis alegrías, haces que todo merezca la pena. Dani, no tengo palabras para agradecerle todo lo que has hecho por mí. Gracias por tu paciencia infinita, por tu apoyo, por venirme a buscar al trabajo cuando salgo tarde, por animarme siempre que lo veo todo negro... En definitiva, gracias por estar siempre a mi lado.



ÍNDICE

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Índice	11
Abreviaturas	15
Resumen	19
Introducción.....	23
Tetraspaninas.....	25
Introducción.....	25
Estructura.....	27
Interacciones de las tetraspaninas.....	29
Funciones.....	33
La tetraspanina CD9	35
Integrinas.....	39
Introducción.....	39
Estructura.....	40
Activación de las integrinas.....	43
Funciones.....	47
La integrina leucocitaria LFA-1	49
Complejos integrina/tetraspanina	51
Objetivos.....	53
Materiales y métodos.....	57
Cultivos celulares	59
Anticuerpos y reactivos	59
Plásmidos y transfecciones.....	60
Citometría de flujo.....	60
Inmunofluorescencia, microscopía confocal y TIRF.....	61
Ensayos de hibridación por proximidad (PLAs).....	63
Preparación de extractos de proteína y análisis por <i>western-blot</i>	63
Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas.....	64
Experimentos de entrecruzamiento químico (<i>crosslinking</i>)	65
Ensayos de arrastre o <i>pull-down</i> con proteínas de fusión recombinantes.....	65
Ensayos de adhesión celular	66
Ensayos de capacidad citotóxica	67
Análisis estadístico	67

Resultados	69
La tetraspanina CD9 interacciona con la integrina LFA-1 en la superficie celular de diferentes tipos de leucocitos.....	71
La interacción entre CD9 y LFA-1 se realiza a través del dominio LEL de CD9.....	80
Anticuerpos anti-CD9 inhiben la adhesión mediada por la integrina LFA-1	82
Los anticuerpos anti-CD9 inhiben la actividad citotóxica mediada por LFA-1	84
La neoexpresión o la inhibición de la tetraspanina CD9 regula la adhesión de LFA-1 a su ligando ICAM-1	85
CD9 no produce cambios en el estado de afinidad de la integrina LFA-1	87
CD9 regula la adhesión mediada por LFA-1 mediante cambios en el agrupamiento de la integrina.....	89
La presencia de CD9 aumenta el número de agrupamientos de LFA-1 en la membrana plasmática pero reduce su tamaño	90
CD9 afecta a la extracción de CD9 de la membrana plasmática	93
Discusión.....	95
Conclusiones.....	105
Bibliografía.....	109
Publicaciones.....	119

ABREVIATURAS

	CASTELLANO	INGLÉS
AcM	Anticuerpo monoclonal	Monoclonal antibody
ADAM	Desintegrina y metaloproteínasa	A desintegrin and metalloproteinase
ALCAM	Molécula de adhesión celular del leucocito activado	Activated leukocyte cell adhesion molecule
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína-acetoximetil éster	2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester
BCL-2	Linfoma de célula B-2	B-cell lymphoma-2
BCR	Receptor de células B	B-cell receptor
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine serum albumin
CD	Antígeno de diferenciación	Cluster of differentiation
c-SMAC	Complejo supramolecular de activación central	Central supramolecular activating cluster
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
DOCK-1	Proteína de citocinesis-1	Dedicator of cytokinesis-1
EAPs	Plataformas de adhesión endotelial	Endothelial adhesive platforms
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	Epidermal growth factor
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Epidermal growth factor receptor
ERM	Ezrina, radixina y moesina	Ezrin, radixin y moesin
ESM	Error estándar de la media	Standard error of the mean
FAK	Quinasa de adhesión focal	Focal adhesion kinase
FBS	Suero fetal bovino	Fetal bovine serum
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Fluorescein isothiocyanate
GSH	Glutación reducido	Reduced glutathione
GST	Glutación S-transferasa	Glutathione S-transferase
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	Heparin-binding epidermal growth factor
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico	4-(2-hydroxyethyl) piperazine 1-ethanesulfonic acid
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICAP-1	Proteína asociada al dominio citoplasmático de las integrinas-1	Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1
IgSF	Superfamilia de las inmunoglobulinas	Immunoglobulin superfamily
IL-2	Interleuquina-2	Interleukin-2
INT	Cloruro de 2-(p-Iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5- fenil tetrazolio	2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride
JAM-A	Molécula de unión adherente-A	Junctional adhesion molecule-A

ABREVIATURAS

LAK	Asesinas activadas por linfoquinas	Lymphokine-activated killer
LDH	Lactato deshidrogenasa	Lactate dehydrogenase
LEL	Dominio extracelular grande	Large extracellular loop
LFA-1	Antígeno asociado a la función de los linfocitos-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	Major histocompatibility complex
MIDAS	Sitio de adhesión dependiente de ion metálico	Metal ion dependent adhesion site
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido	Nicotinamide adenine dinucleotide
NK	Asesina natural	Natural killer
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate buffered saline
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI4K	Fosfatidilinositol-4 quinasa	Phosphatidylinositol 4-kinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Proteína quinasa C	Protein kinase C
PLAs	Ensayos de hibridación por proximidad	Proximity ligation assays
PMA	Acetato de forbol miristato	Phorbol myristate acetate
PSI	Plexina-semaforina-integrina	Plexin-semaphorin-Integrin
p-SMAC	Complejo supramolecular de activación periférico	Peripheral- supramolecular activating cluster
RNA	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
RPMI		Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Dodecilsulfato sódico – electroforesis en gel de poliacrilamida	Sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis
SEL	Dominio extracelular corto	Short extracellular loop
shRNA	ARN pequeño en horquilla	short hairpin RNA
TBS	Tampón Tris salino	Tris buffered saline
TCR	Receptor de células T	T-cell receptor
TEM	Microdominio enriquecido en tetraspaninas	Tetraspanin-enriched microdomain
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa	Transforming growth factor alpha
TIRF	Fluorescencia de reflexión interna total	Total internal reflection fluorescence
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana	Human immunodeficiency virus

RESUMEN

La tetraspanina CD9 interacciona con distintos miembros de las subfamilias $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ de las integrinas. A través de esta interacción CD9 regula la adhesión, la migración y la señalización celular. Sin embargo, hasta este momento no se había descrito ninguna interacción de esta tetraspanina con miembros de la subfamilia $\beta 2$. Los resultados de colocalización, hibridación por proximidad y co-inmunoprecipitación, que se presentan en esta tesis, muestran que CD9 se asocia con la integrina de la subfamilia $\beta 2$ LFA-1 en la superficie de distintos tipos de leucocitos (linfocitos T, B y células monocíticas). Esta interacción es resistente a condiciones de solubilización fuertes, lo que apunta, junto con los resultados de los ensayos de *pull-down* y entrecruzamiento químico, a una interacción directa entre las dos moléculas que se produce a través del dominio extracelular grande de CD9. Además, CD9 regula funcionalmente a la integrina LFA-1, puesto que la presencia de esta tetraspanina inhibe la adhesión de LFA-1 a su ligando ICAM-1 y la citotoxicidad celular dependiente de esta unión. La regulación de CD9 sobre LFA-1 no implica cambios en la afinidad de la integrina, pero sí cambios en su avidez que se evidencian por la alteración causada por CD9 en el patrón de distribución de LFA-1 en la superficie celular. Curiosamente, la regulación que ejerce CD9 sobre la adhesión de integrinas de la subfamilia $\beta 1$ es inversa a la observada para la integrina LFA-1.

The tetraspanin CD9 interacts with different members of the $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 4$ subfamilies of integrins and through these interactions regulates cell adhesion, migration and signalling. However, the interaction of CD9 with any member of the $\beta 2$ subfamily of integrins had not been reported so far. The confocal microscopy co-localization, in situ Proximity Ligation Assays and co-immunoprecipitation results that are presented here show that CD9 associates with the $\beta 2$ integrin LFA-1 on the surface of different types of leukocytes (including T, B and monocytic cells). This association is resistant to stringent solubilisation conditions which, together with data from chemical crosslinking and pull-down experiments, suggests a primary/direct type of interaction mediated by the large extracellular loop (LEL) of the tetraspanin. CD9 exerts inhibitory effects on the adhesive function of LFA-1 and on LFA-1-dependent leukocyte cytotoxic activity. The mechanism responsible for the negative regulation exerted by CD9 on LFA-1 adhesion does not involve changes in the affinity state of this integrin but seems to be related to alterations in its state of aggregation. Interestingly, CD9 regulates in an inverse manner the adhesive properties of the $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins expressed on the same leukocytes.

INTRODUCCIÓN

TETRASPANINAS

Introducción

Las tetraspaninas son una superfamilia de pequeñas proteínas de membrana que se encuentran ampliamente distribuidas en eucariotas. Existen miembros de esta familia de proteínas en hongos (ej. *Rhizopus oryzae*), plantas (ej. *Arabidopsis thaliana*), nematodos (ej. *Caenorhabditis elegans*), insectos (ej. *Drosophila melanogaster*) y vertebrados (ej. *Mus musculus*), lo que indica que estas moléculas aparecieron pronto durante el proceso de evolución (Boucheix y col., 2001; Hemler, 2003). En la especie humana se han caracterizado 33 tetraspaninas diferentes (Charrin y col., 2014; García-España y col., 2008; Hemler, 2008) entre las que se incluyen: I. Los antígenos celulares de diferenciación (CD) leucocitarios CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 y CD151 (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2003; Tarrant y col., 2003); II. Las proteínas del aro exterior del fotorreceptor de la retina Rom1 y RDS/periferina (van Soest y col., 1999); III. Las tetraspaninas que se han identificado en tumores TALLA-1, CO-029 y SAS (Jankowski y col., 1994; Szala y col., 1990); IV. Las uroplaquinas UP1a y UP1b que forman parte del urotelio (Sun y col., 1996); y V. Diferentes tetraspaninas que han sido descubiertas mediante la búsqueda en bases de datos a través de

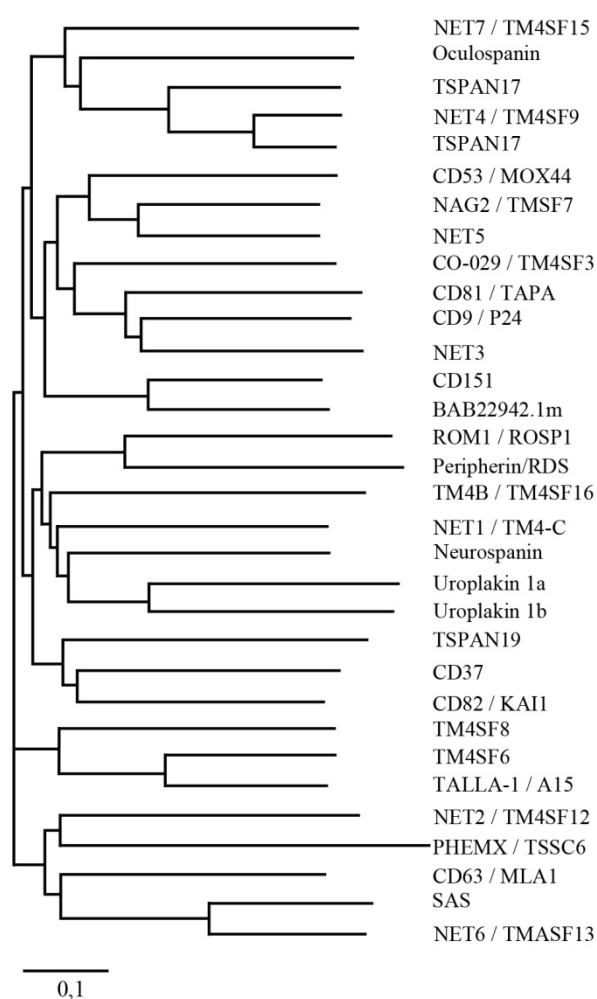


Figura 1: Árbol de las distancias genéticas entre las diferentes tetraspaninas de mamíferos. La longitud de los brazos indica la distancia genética entre las tetraspaninas (0,1 = 10 % de diferencia en la secuencia de aminoácidos). Todas las secuencias usadas son de humano, excepto BAB22942.1m que es de ratón. (Modificado de Hemler, 2003).

INTRODUCCIÓN

secuencias consenso, como NET-1, NET-3 o NET-7 (Serru y col., 2000; Todd y col., 1998) (**Figura 1**). Las tetraspaninas poseen una estructura génica altamente conservada, lo que sugiere que se han formado a partir de un antecesor común mediante un proceso de duplicación (Boucheix y Rubinstein, 2001). La tetraspanina humana más antigua se remonta al momento de la separación entre protóstomos y deuteróstomos (TSPAN15), aunque la mayoría de las tetraspaninas humanas aparecieron cuando se originó el subfilo de los vertebrados (**Figura 2**) (García-España y col., 2008).

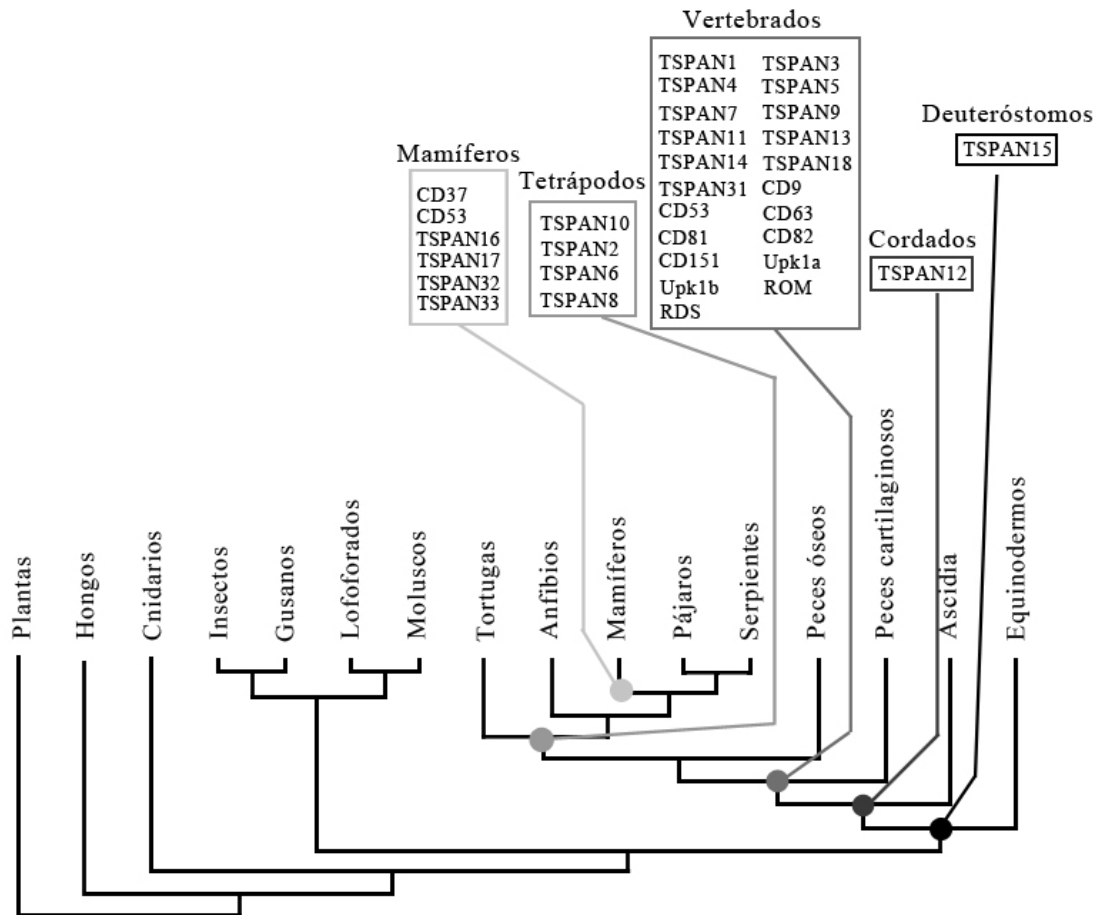


Figura 2: Origen de las tetraspaninas humanas. En el esquema se representan los cinco puntos del origen ancestral de las tetraspaninas humanas (mamíferos, tetrápodos, vertebrados, cordados y deuteróstomos). Los distintos puntos están representados por diferentes tonalidades de grises. (Modificado de García-España, 2008).

Todas las células de mamífero expresan varias tetraspaninas en su superficie, con excepción de los eritrocitos, pero su distribución varía mucho de unos tipos celulares a otros. Algunas tetraspaninas presentan un patrón de distribución muy amplio, como CD151, CD81 y CD82, mientras que otras pertenecen a estructuras muy especializadas, como UP1a y UP1b que se encuentran en el urotelio o las proteínas RDS/periferina o Rom-1 de los fotorreceptores de la retina. Otros ejemplos de tetraspaninas que poseen una distribución restringida son: CD53, que se encuentra sólo en leucocitos, y CD37, que sólo se expresa de manera abundante en los

linfocitos B (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2005; Le Naour y col., 2006). La mayoría de las tetraspaninas se expresan en la superficie celular, pero algunas tetraspaninas pueden localizarse también en compartimentos intracelulares. Por ejemplo, CD63 se expresa en los lisosomas y CD151 en endosomas de células endoteliales (Azorsa y col., 1991; Sincock y col., 1999). Otras tetraspaninas como CD37, CD53, CD63, CD81 y CD82 se localizan también en la membrana interna de los compartimentos citoplásmicos ricos en MHC (*Major Histocompatibility Complex* o complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II de linfocitos B y, por tanto, en los exosomas derivados de estos compartimentos (Hammond y col., 1998; Raposo y col., 1996).

Estructura

Los diferentes miembros de la familia de las tetraspaninas no presentan una alta homología de secuencia entre sí; sin embargo, tienen una estructura secundaria y terciaria muy conservada (Yáñez-Mó y col., 2009). Su tamaño varía entre los 204 y los 355 aminoácidos (20-30 kDa) de las tetraspaninas NET-6 y oculospanina, respectivamente (Bassani y Cingolani, 2012). Como su propio nombre indica, las tetraspaninas atraviesan (*span*) cuatro veces (*tetra*) la membrana celular delimitando dos regiones extracelulares de diferente tamaño. La primera región extracelular, situada entre el primer y el segundo dominio transmembrana, es la más pequeña (contiene entre 13-31 aminoácidos) y se conoce como dominio extracelular corto o SEL (*Short Extracellular Loop*). La segunda región extracelular se denomina dominio extracelular grande o LEL (*Large Extracellular Loop*) y posee entre 62 y 132 aminoácidos (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2005). El dominio LEL se divide en dos regiones, una región constante que está formada por tres hélices α (A, B y E) y una región variable (poco conservada entre las tetraspaninas) que contiene sitios específicos de unión proteína-proteína. Además, las tetraspaninas poseen un dominio intracelular, formado sólo por 4 aminoácidos situado entre el segundo y el tercer dominio transmembrana, y dos extremos N y C terminales dirigidos hacia el citoplasma (**Figura 3**) (Berditchevski, 2001; Hemler, 2008).

Las tetraspaninas poseen ciertas características estructurales específicas que las diferencian de otras proteínas con cuatro dominios transmembrana, como la presencia de 4 a 8 cisteínas en la región variable del dominio LEL que se unen entre sí formando dos, tres o cuatro puentes disulfuro que son cruciales para el correcto plegamiento de este dominio (Levy y Shoham, 2005b). Cuatro de estas cisteínas están conservadas en casi todas las tetraspaninas, incluyendo dos cisteínas que se encuentran de 28 a 47 residuos después del tercer dominio transmembrana y que aparecen en un motivo CCG y otra cisteína que aparece aproximadamente 11 aminoácidos antes del cuarto dominio transmembrana (Hemler, 2003). La cuarta cisteína está conservada en

INTRODUCCIÓN

el 94 % de las tetraspaninas y se encuentra en un dominio PXXC (Pro-Xaa-Xaa-Cys) (Berditchevski, 2001; Stipp y col., 2003).

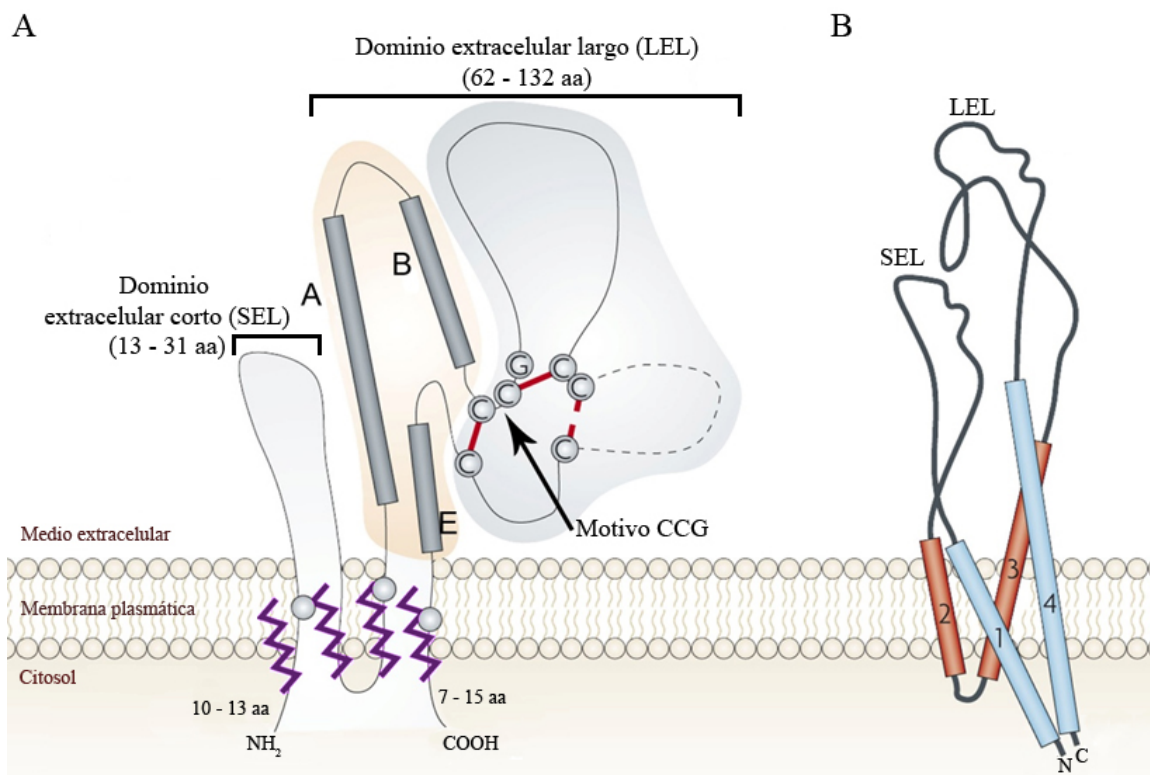


Figura 3: Estructura de las tetraspaninas. A) Representación esquemática de la estructura desplegada de las tetraspaninas. Las tetraspaninas presentan un dominio extracelular corto (SEL) y un dominio extracelular grande (LEL). La región constante del dominio LEL, sombreada en color rosa, posee tres hélices α (A, B y E). La región variable, sombreada en azul, contiene el motivo CCG y dos puentes disulfuro (marcados con líneas rojas). En algunas tetraspaninas aparece un tercer puente disulfuro que forma un bucle adicional (línea discontinua). En su región transmembrana las tetraspaninas poseen residuos hidrofílicos (esferas grises) y pueden estar palmitoiladas (líneas moradas). B) Representación del plegamiento de una tetraspanina cuando se encuentra en la membrana. Los cuatro dominios transmembrana se pliegan entre sí y los dominios LEL y SEL están muy juntos, lo que confiere a las tetraspaninas forma de barra (modificado de Hemler, 2008).

La estructura del dominio LEL de la tetraspanina CD81 ha sido determinada mediante técnicas de cristalografía y ha permitido profundizar en las funciones de este dominio (Kitadokoro y col., 2001). En esta tetraspanina, la región hidrofóbica que comprende las hélices A, B y E parece ser el sitio de homodimerización. CD81 posee dos hélices α adicionales (C y D) situadas en la región variable del LEL, que probablemente están implicadas en la interacción proteína-proteína (Stipp y col., 2003). Muchas de las interacciones laterales que se han descrito hasta el momento de las tetraspaninas con otras proteínas de membrana son mediadas por la región variable de este dominio. Concretamente, esta región de la tetraspanina CD9 juega un papel fundamental en la fusión óvulo-espermatozoide (Zhu y col., 2002). Además, la mayoría

de las mutaciones en la periferina/RDS que acaban produciendo una enfermedad se encuentran en esta región (Stipp y col., 2003).

La mayoría de las tetraspaninas contienen residuos glicosilados en el dominio LEL. Sin embargo, CD81 y NET-2 no están glicosiladas y CD9 posee residuos glicosilados en el dominio SEL (Boucheix y Rubinstein, 2001). El estado de glicosilación de las tetraspaninas es muy importante para el establecimiento de interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, la asociación de CD82 con $\alpha 3\beta 1$ o con $\alpha 5\beta 1$ es dependiente del grado de glicosilación tanto de la tetraspanina como de la integrina (Ono y col., 2000).

Las colas citoplasmáticas de las tetraspaninas contienen menos de 19 aminoácidos, aunque NET-2, NET-7, periferina/RDS y Rom-1 tienen un dominio C-terminal más largo (Boucheix y Rubinstein, 2001; Charrin y col., 2014). El dominio citoplasmático puede contener sitios de unión a proteínas del citoesqueleto o a moléculas señalizadoras como la proteína quinasa C (PKC - *Protein Kinase C*) (Zhang y col., 2001b). Las colas citoplasmáticas también pueden presentar motivos estructurales especializados. Un ejemplo es el motivo rico en tirosinas que permite la localización de la tetraspanina CD63 en compartimentos intracelulares como los endosomas (Charrin y col., 2014; Rous y col., 2002).

Los cuatro dominios transmembrana presentes en las tetraspaninas se encargan de estabilizar a estas proteínas durante su biosíntesis y también participan en la interacción de las tetraspaninas con otras proteínas de membrana (Levy y Shoham, 2005b). En estos dominios transmembrana las tetraspaninas tienen residuos hidrofílicos altamente conservados que pueden formar puentes de hidrógeno entre ellos o con otros residuos, estabilizando así la estructura terciaria de las tetraspaninas (Hemler, 2003; Stipp y col., 2003).

Las tetraspaninas presentan varios sitios de palmitoilación que contribuyen a la formación de complejos de tetraspaninas. En las tetraspaninas CD9 y CD151 se encuentran palmitoilados los residuos de cisteína cercanos a los cuatro dominios transmembrana y si se impide la palmitoilación se reducen sus interacciones laterales con otras tetraspaninas. Cabe destacar que la inhibición de la palmitoilación no afecta a los complejos tetraspanina-tetraspanina ya formados, es decir, sólo sería necesaria para la formación inicial de estos complejos (Berdichevski y col., 2002; Charrin y col., 2002; Yang y col., 2002).

Interacciones de las tetraspaninas

La característica más destacable de las tetraspaninas es su capacidad de organizar a otras proteínas de la superficie celular en complejos transductores de señales. Estos complejos multimoleculares son conocidos como microdominios ricos en tetraspaninas (TEMs – *Tetraspanin-*

INTRODUCCIÓN

Enriched Microdomains), también llamados red de tetraspaninas (*tetraspanin web*) (Hemler, 2008; Tarrant y col., 2003). Todavía no se conoce la composición exacta de los TEMs, sin embargo se han caracterizado algunas de las proteínas que los componen: moléculas de adhesión, principalmente integrinas y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF); factores de crecimiento; receptores celulares y enzimas (**Figura 4**) (Boucheix y col., 2001; Charrin y col., 2014; Yáñez-Mó y col., 2009). Existe una gran heterogeneidad en el tamaño de estos TEMs entre los distintos tipos celulares. Un ejemplo extremo es el TEM que recubre la membrana apical del epitelio del tracto urinario, donde las uroplaquinas Ia y Ib se asocian con dos proteínas (UPII y UPIII) con una estequiometría 1:1 formando partículas de 16 nm. Sin embargo, en otros tipos celulares los TEMs pueden cubrir áreas de 200-400 nm² (Yáñez-Mó y col., 2009; Yáñez-Mó y col., 2001).

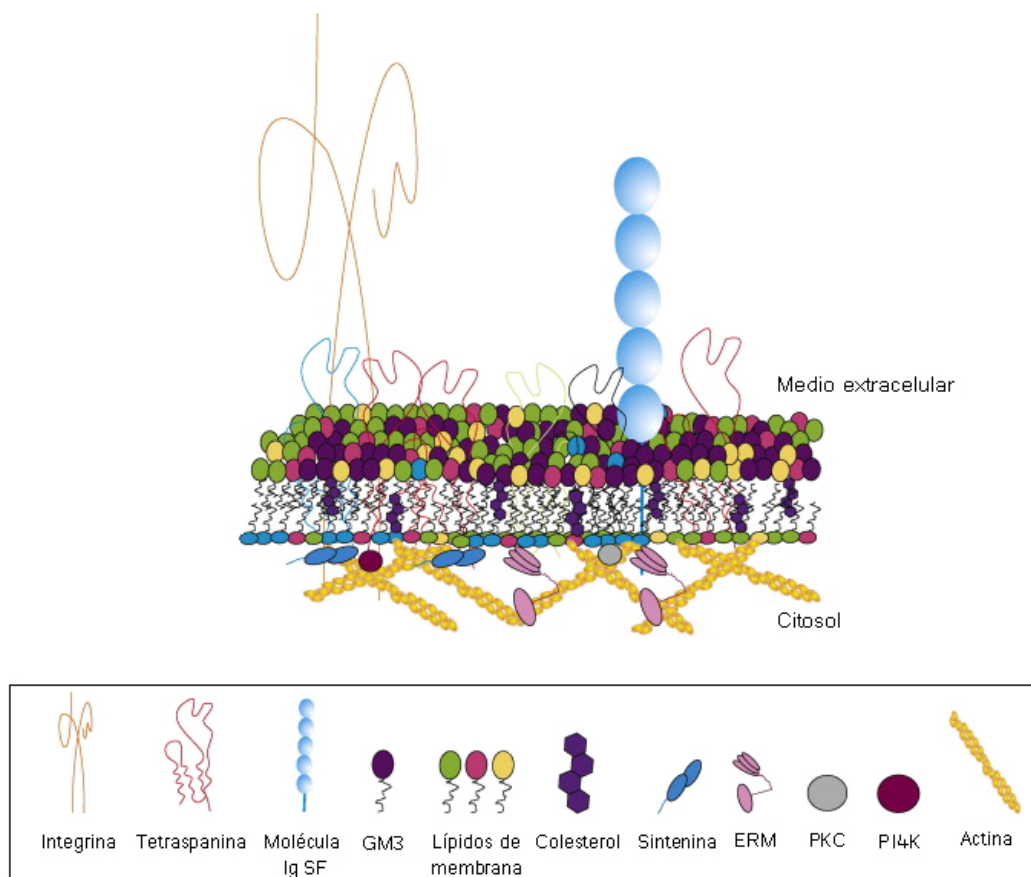


Figura 4: Representación esquemática de un microdominio rico en tetraspaninas (TEM). Las tetraspaninas se asocian con integrinas, con receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) y otras proteínas de membrana formando los TEMs. Además, se pueden unir al colesterol de la membrana, anclar al citoesqueleto de actina mediante su unión a las proteínas ERM y conectar con cascadas de señalización intracelular específicas. Las moléculas no están representadas a escala real (modificado de Yáñez-Mó y col., 2009).

INTRODUCCIÓN

Las interacciones de las tetraspaninas con otras moléculas de la superficie celular han sido clasificadas en tres categorías diferentes dependiendo de su estequiometría y de su resistencia a la solubilización con determinados detergentes: interacciones primarias, secundarias y terciarias (**Figura 5**).

Las interacciones primarias corresponden a asociaciones directas de una tetraspanina con otra proteína y poseen una alta estequiometría y estabilidad frente a detergentes fuertes como el Tritón-X100 (Hemler, 2003). El mejor ejemplo de una interacción lateral altamente específica de una tetraspanina con otra proteína de membrana es la asociación entre CD151 y las integrinas $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$. Hasta el momento no se ha encontrado ninguna célula en la que esté presente la integrina $\alpha 3\beta 1$ y no se encuentre CD151 (Stipp et al., 2003). Otros ejemplos de interacciones primarias son: CD9 con EWI-2, CD81 con EWI-2 y con CD19, y las uroplaquinas Ia y Ib con las proteínas UPII y UPIII respectivamente.

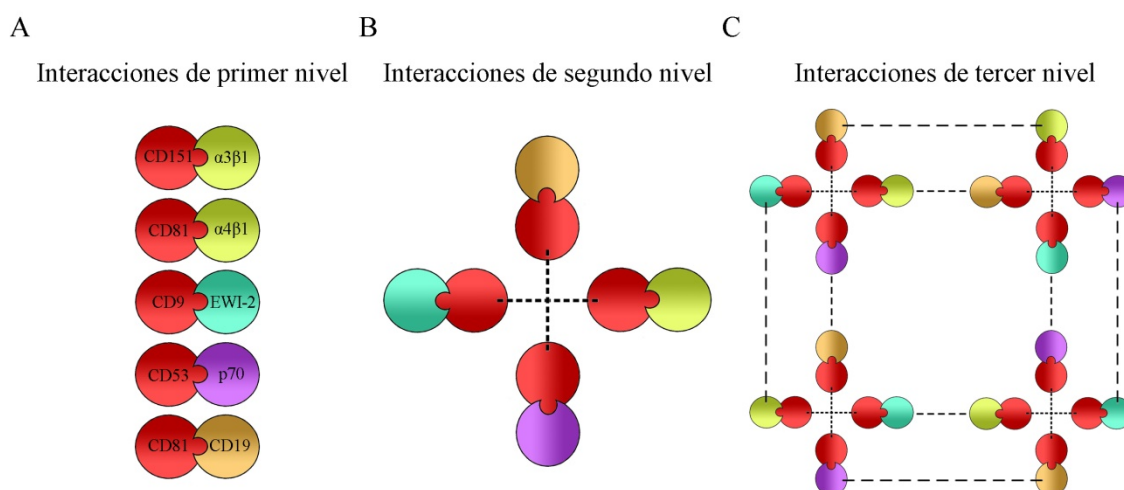


Figura 5: Clasificación de las interacciones de las tetraspaninas. Las interacciones de las tetraspaninas con otras proteínas de membrana se clasifican en tres tipos según su resistencia a la solubilización con determinados detergentes. Las interacciones primarias (**A**) son resistentes a la solubilización en Tritón-X100 y están compuestas de una tetraspanina (círculos rojos) asociada fuertemente a otra proteína (círculos verde, azul, morado y marrón). Las interacciones de segundo nivel (**B**) son resistentes a la solubilización en detergentes de fuerza media como el Brij-97. Este segundo nivel está formado por los complejos anteriores (primarios) unidos entre sí a través de interacciones tetraspanina-tetraspanina (representadas por líneas discontinuas). Los complejos de tercer nivel (**C**) sólo son resistentes a la solubilización en detergentes suaves como el CHAPS y están formados por complejos de segundo nivel asociados entre sí.

Las interacciones secundarias son más abundantes pero menos robustas que las primarias, aunque siguen siendo estables en detergentes hidrofóbicos como el Brij-96 o el Brij-97. Estas interacciones se producen por la asociación de las diferentes tetraspaninas entre sí, uniendo, de esta forma, diferentes complejos primarios. Por último, las interacciones terciarias son las más

débiles, sólo se pueden detectar cuando se lisan las células con detergentes débiles (como CHAPS o Brij-99) y corresponden a las asociaciones que se observan entre las diferentes proteínas asociadas a las tetraspaninas, dando lugar a grandes agrupamientos de complejos primarios y secundarios que poseen un alto grado de plasticidad (TEMs) (Hemler, 2003; Hemler, 2005).

Para la formación de los TEMs es muy importante la palmitoilación de las tetraspaninas. Al analizar las proteínas que presentan palmitoilación en los complejos de tetraspaninas se ha observado que no sólo las tetraspaninas están palmitoiladas sino que algunas de las proteínas asociadas a las mismas también lo están. Éste es el caso de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\beta 4$ de las integrinas o EWI-2. La eliminación de esta palmitoilación no rompe las interacciones primarias pero sí reduce las asociaciones secundarias de las tetraspaninas (Hemler, 2005). Por ejemplo, si se eliminan las cisteínas palmitoiladas de la subunidad $\beta 4$ no se rompe la interacción primaria de CD151 con $\alpha 6\beta 4$ pero sí se pierde la asociación de este complejo con otras tetraspaninas como CD9, CD81 y CD63 (Yang y col., 2004).

Entre las proteínas que componen los TEMs se encuentran: I. Proteínas de la IgSF, como EWI-2, EWI-F, los antígenos CD4 y CD8 de los linfocitos T y los ligandos de adhesión ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) y VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*); II. Factores de crecimiento como el TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*) y HB-EGF (*Heparin-Binding Epidermal Growth Factor*); III. Diferentes integrinas de las subfamilias $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$; y IV. Moléculas señalizadoras, entre las que se encuentran PKC, PI4K (*Phosphatidylinositol 4-Kinase*) y las proteínas G heterotriméricas (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2003; Levy y Shoham, 2005a; Yáñez-Mó y col., 2009; Yáñez-Mó y col., 2001).

Entre las interacciones mejor caracterizadas de las tetraspaninas, destaca su asociación con las integrinas $\beta 1$. Los complejos formados por integrinas $\beta 1$ -tetraspaninas, presentes en muchos tipos celulares, son funcionalmente relevantes y están implicados en la regulación de la migración y la adhesión celular (Berditchevski, 2001; Boucheix y Rubinstein, 2001; Tarrant y col., 2003; Yáñez-Mó y col., 2001). Aunque estas interacciones han sido muy estudiadas, sólo se ha caracterizado la zona de interacción entre una integrina de la subfamilia $\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, y la tetraspanina CD151. Esta asociación se produce entre la subunidad α de la integrina (concretamente entre los residuos 569 y 705) y el dominio LEL de la tetraspanina (residuos 149-213) (Berditchevski, 2001). A través de esta unión, y de la interacción con otras integrinas ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$), CD151 regula la adhesión a distintos tipos de laminina, modulando la morfología, la migración, la señalización y la adhesión celular (Hemler, 2005).

Funciones

Las tetraspaninas participan en una gran variedad de actividades celulares como la adhesión, migración, invasión, supervivencia, diferenciación, comunicación inter e intracelular y la fusión de membranas (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2005; Yáñez-Mó y col., 2009).

La comunicación intercelular es clave en el proceso de activación de los linfocitos (como ocurre en la cooperación entre células B y T o en la presentación de antígeno) y en la extravasación y maduración de los leucocitos (Yáñez-Mó y col., 2001). El hecho de que las células presentadoras de antígeno que no poseen TEMs (como las células dendríticas inmaduras) no sean capaces de producir una buena estimulación de los linfocitos T, hace pensar que las tetraspaninas son moléculas indispensables en el proceso de presentación de antígeno (Tarrant y col., 2003). En este sentido, se ha comprobado que las tetraspaninas CD9, CD53, CD81 o CD82 son capaces de generar señales co-estimuladoras, diferentes e independientes de las que se producen a través de CD28, en el proceso de activación de los linfocitos T mediado por CD3 (Tarrant y col., 2003). Por ejemplo, la co-estimulación producida por las tetraspaninas CD81 y CD9, al contrario de la producida por CD28, no provoca un aumento de IL-2 (Levy y Shoham, 2005b). Las señales co-estimuladoras mediadas por CD81 producen un aumento de la interacción entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno a través de un aumento de la adhesión entre la integrina LFA-1 y su ligando ICAM-1 (Tarrant y col., 2003; Yáñez-Mó y col., 2001). Por otro lado, se ha observado que algunas tetraspaninas se relocalizan en las zonas de contacto de la sinapsis inmune, tanto en los linfocitos T como en las células presentadoras de antígeno. Cuando se produce una sinapsis inmune, las tetraspaninas CD81 y CD82 se relocalizan en el anillo central (c-SMAC, *central-SupraMolecular Activation Cluster*) de la sinapsis. CD81 es capaz de regular la estructura, la organización y la maduración de la sinapsis inmune y CD82 contribuye a la activación de la sinapsis mediante la regulación del citoesqueleto de actina y aumenta la adhesión de la integrina LFA-1 a su ligando ICAM presente en las células presentadoras de antígeno (Tarrant y col., 2003). Las tetraspaninas CD9 y CD151, contribuyen a la activación de los linfocitos T mediante el reclutamiento a la sinapsis inmune de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (y otras integrinas $\beta 1$) en conformación de alta afinidad (Rocha-Perugini y col., 2014). En la superficie de las células dendríticas la tetraspanina CD9 es necesaria para la asociación lateral heteróloga de las moléculas del MHC de clase II. Además, distintos subtipos de células dendríticas presentan diferente expresión de CD9 en función de su capacidad presentadora de antígeno (Mittelbrunn y col., 2009; Yáñez-Mó y col., 2009).

Además de su papel en la sinapsis inmune, las tetraspaninas están implicadas en la regulación de la movilidad de los leucocitos y en su adhesión a la matriz extracelular o al endotelio, mediante su asociación con las integrinas $\alpha L\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. En el proceso de

extravasación de las células inmunes, las integrinas ejercen un papel fundamental tanto en las células endoteliales como en los leucocitos. En las células hematopoyéticas se expresan diferentes tetraspaninas que se localizan preferentemente en las microvellosidades, que son estructuras fundamentales para establecer las uniones celulares entre los leucocitos y las células endoteliales (Barreiro y col., 2008; Yáñez-Mó y col., 2001).

Algunas tetraspaninas están implicadas en la patogénesis de varios virus y, en la mayoría de los casos, las tetraspaninas regulan la fusión célula-célula o la formación de los sincitios. Se sabe que anticuerpos inhibidores dirigidos frente a las tetraspaninas CD81 y CD9 aumentan la formación de los sincitios producidos por las proteínas de la envuelta del virus VIH y la entrada de este virus en los linfocitos T humanos, mientras que su sobreexpresión hace que las células sean menos susceptibles a la formación de sincitios (Gordon-Alonso y col., 2006). Por otro lado, CD81 se une directamente a la proteína E2 del virus de la hepatitis C y, aunque no es el único receptor del virus, su asociación con la proteína Claudina-1 tiene un papel crucial en la entrada del virus a los hepatocitos (Harris y col., 2008).

La actuación de las tetraspaninas en la migración celular ha sido ampliamente estudiada, ya que están implicadas en la migración tanto de células epiteliales como de células endoteliales. En las células que están migrando, tanto las tetraspaninas como la integrina $\alpha 3 \beta 1$ se localizan en las estructuras relacionadas con la motilidad, como los filopodios y las ondulaciones de la membrana plasmática (*ruffles*) que se producen en la zona de avance de la célula. Además, los complejos formados por integrinas y tetraspaninas son capaces de asociarse a la fosfatidilinositol-4 quinasa (PI4K), que participa en la producción del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (4,5-PIP₂) que es un regulador del citoesqueleto, interviniendo de este modo en la motilidad celular (Boucheix y col., 2001). Por el contrario, en epitelios establecidos y en monocapas de células endoteliales, los complejos tetraspanina- $\alpha 3 \beta 1$ se localizan en las uniones intercelulares, ayudando a la cohesión entre las células (Yáñez-Mó y col., 2001).

Como queda demostrado por los datos presentados hasta ahora, las interacciones entre las tetraspaninas y otras proteínas de membrana son muy importantes en muchos y diversos procesos celulares. Por este motivo, no es de extrañar que se alteren los niveles de expresión de las tetraspaninas en la transformación de las células normales en células tumorales. Los niveles de expresión de ciertas tetraspaninas varían en función del estado de desarrollo del tumor o cuando aparece metástasis. Por ejemplo, CD63 está fuertemente expresado en etapas tempranas del desarrollo de los melanomas, pero su expresión se inhibe en estados avanzados. Otro ejemplo es el de CD9 y CD82 cuya expresión baja en tumores primarios de mama, pulmón, colon y páncreas cuando existe metástasis y, esta bajada, predice una menor tasa de supervivencia (Boucheix y Rubinstein, 2001). Al igual que CD9 y CD82, la mayoría de las tetraspaninas presentan niveles de expresión más bajos en los tumores metastáticos, respecto a

tumores no metastáticos, con la excepción de las tetraspaninas CD151 y TSPAN8 que promueven la metástasis. CD151 promueve la aparición del tumor, la progresión y la metástasis en cánceres de pulmón y de piel y TSPAN8 potencia la metástasis en melanomas y carcinomas hepatocelulares (Charrin y col., 2014; Hemler, 2014). También se ha observado que el aumento de la expresión de distintas tetraspaninas inhibe el crecimiento tumoral y la invasión. Por ejemplo, la presencia de CD9 reduce la invasión y la metástasis en varios tipos de células cancerosas y también inhibe el crecimiento primario del carcinoma de colon (Ovalle y col., 2007; Yáñez-Mó y col., 2009). Aunque CD9 es considerado como un supresor tumoral, en algunos tipos tumorales, como melanomas, es capaz de favorecer la angiogénesis, la linfangiogénesis, el crecimiento tumoral y la invasión. Los distintos papeles de CD9 en el desarrollo de diferentes tipos de tumores seguramente sean causados por la influencia de las proteínas asociadas a CD9, que varían en función del tipo celular (Hemler, 2014).

Otras funciones en las que también están implicadas las tetraspaninas y que se comentarán en el siguiente apartado son: la formación de miotubos, la fusión de los gametos y la regulación de la mielinización del sistema nervioso periférico (Yáñez-Mó y col., 2001).

Aunque la mayoría de los trabajos realizados con las tetraspaninas están enfocados a estudiar las funciones derivadas de las interacciones laterales de éstas con otras proteínas de la membrana plasmática, las tetraspaninas también son abundantes en los compartimentos vesiculares intracelulares. Por lo tanto los TEMs también podrían estar regulando las uniones de receptores intracelulares o las rutas de reciclaje intracelular. Además, los exosomas son vesículas enriquecidas con tetraspaninas que tienen funciones claras en la activación del sistema inmune y el cáncer (Yáñez-Mó y col., 2009).

La tetraspanina CD9

CD9 es una tetraspanina de 21-24 kDa que se expresa abundantemente en la superficie de células endoteliales, de algunos leucocitos y de muchas células tumorales (Charrin y col., 2001; Hemler, 2014; Yáñez-Mó y col., 2009). En un principio CD9 se caracterizó como un marcador linfohematopoyético. Basándose en los efectos inhibitorios de algunos anticuerpos monoclonales, específicos para esta proteína, en la motilidad y la migración de células tumorales, esta tetraspanina recibió inicialmente el nombre de MRP-1 (*Motility-Related Protein-1*) (Boucheix y col., 1985; Miyake y col., 1991).

La estructura de CD9 es la típica de una tetraspanina, sin embargo, CD9 se encuentra N-glicosilada en el dominio SEL mientras que la mayoría de las tetraspaninas están glicosiladas en el dominio LEL (Boucheix y Rubinstein, 2001). Además, la tetraspanina CD9 está acilada y palmitoilada (Charrin y col., 2002; Seehafer y col., 1988).

CD9 interacciona con distintas proteínas entre las que se encuentran moléculas de adhesión (como algunas integrinas y ciertos miembros de la IgSF), moléculas del sistema inmune, factores de crecimiento y moléculas señalizadoras, como se resume en la **tabla I**. CD9 también se asocia directamente con otras tetraspaninas como CD63, CD81, CD82 y CD151 (Le Naour y col., 2006; Rubinstein y col., 1996; Yáñez-Mó y col., 2009).

En los ratones que tienen inhibida la expresión de la tetraspanina CD9 no se observan grandes defectos en el crecimiento, en el desarrollo o en el sistema inmune, aunque estos ratones presentan defectos en la mielinización del sistema nervioso periférico y en las uniones entre algunas de las células nerviosas, tanto del cerebro como del sistema nervioso periférico (Hemler, 2005). Además, en estos ratones existe una anomalía en el proceso de fusión óvulo-espermatozoide que hace que las hembras sean estériles, siendo necesaria la presencia de CD9 para que se produzca correctamente la fusión entre los dos tipos celulares, aunque no es necesaria para su unión (Boucheix y Rubinstein, 2001; Kaji y col., 2000; Le Naour y col., 2000). CD9 también participa en otras funciones en las que se produce fusión celular, como la formación de sincitios en infecciones virales y la fusión de mioblastos para formar fibras musculares. En el proceso de fusión de los mioblastos la inhibición de CD9 retrasa la formación de las fibras musculares en el ratón (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2005). Al contrario de lo que ocurre en estos procesos, CD9 también puede inhibir el proceso de fusión celular, como ocurre en los monocitos. Se piensa que en este caso CD9 actúa reclutando en los TEMs ciertas proteínas que impiden la fusión celular, como algunas proteasas específicas (Takeda y col., 2003).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la implicación de la tetraspanina CD9 en cáncer ha sido estudiada en profundidad. Se ha comprobado que existe una correlación inversa entre la expresión de CD9 en tumores primarios y el potencial metastático del tumor en melanomas (Si y Hersey, 1993) y carcinomas de colon (Mori y col., 1998), de pulmón (Higashiyama y col., 1995) y de mama (Miyake y col., 1996). Mediante el estudio del efecto que producen ciertos anticuerpos dirigidos frente a CD9 en la movilidad y la migración celular, se ha observado que la sobreexpresión de CD9 en determinados tipos de células tumorales reduce la motilidad y el potencial metastático de estas células (Higashiyama y col., 1995; Mori y col., 1998). Estos efectos de CD9 pueden ser explicados, al menos en parte, por el papel de CD9 sobre la adhesión y migración celular dependiente de integrinas (Boucheix y Rubinstein, 2001; Hemler, 2003). CD9 también reduce la capacidad tumorigénica de células de colocal carcinoma humano, puesto que un aumento en la expresión de CD9 reduce la proliferación de las células tumorales y reduce la aparición de tumores en ratones (Ovalle y col., 2007).

MOLÉCULA ASOCIADA	OTRAS TETRASPANINAS	REFERENCIAS DE CD9
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN		
Integrinas		
$\alpha 1\beta 1$		(Lozahic y col., 2000)
$\alpha 2\beta 1$	CD151	(Jones y col., 1996; Scherberich y col., 1998)
$\alpha 3\beta 1$	CD63, CD81, CD82, CD151, NAG-2, Co-029	(Jones y col., 1996; Scherberich y col., 1998)
$\alpha 4\beta 1$	CD53, CD81, CD82, CD151	(Rubinstein y col., 1994; Rubinstein y col., 1996)
$\alpha 5\beta 1$	CD151	(Rubinstein y col., 1994)
$\alpha 6\beta 1$	CD63, CD81, CD82, CD151, NAG-2, Co-029	(Berditchovski y col., 1996; Rubinstein y col., 1996)
$\alpha 7\beta 1$	CD151	(Berditchovski, 2001)
$\alpha \text{IIb}\beta 3$	CD151	(Indig y col., 1997; Longhurst y col., 1999)
$\alpha 6\beta 4$	CD151	(Jones y col., 1996)
Familia de las inmunoglobulinas		
ICAM-1		(Barreiro y col., 2005)
EpCAM	Co-29, Tspan8, D6.1A	(Schmidt y col., 2004)
B-CAM		(Le Naour y col., 2006)
ALCAM		(Gilsanz y col., 2013)
Otros receptores de adhesión		
CD42		(Longhurst y col., 1999; Slupsky y col., 1989)
CD44	Co-29, Tspan8, D6.1A	(Jones y col., 1996)
CD47		(Longhurst y col., 1999)
Claudina-1		(Boucheix y col., 2001)
Sindecano		(Jones y col., 1996)
MOLÉCULAS DEL SISTEMA INMUNE		
HLA-DR	CD153, CD81, CD82	(Rubinstein y col., 1996)
CD2	CD53	(Tarrant y col., 2003)
CD3	CD81, CD82	(Toyo-oka y col., 1999)
CD4	CD81, CD82	(Toyo-oka y col., 1999)
CD5		(Toyo-oka y col., 1999)
CD19	CD81	(Horvath y col., 1998)
CD46		(Lozahic y col., 2000)
FACTORES DE CRECIMIENTO		
Pro-TGF- α		(Shi y col., 2000)
Pro-HB-EGF		(Nakamura y col., 1995)
MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN		
CD117	CD63, CD81	(Anzai y col., 2002)
GPCR56	CD81	(Little y col., 2004)
PI4K	CD81, CD151, CD63	(Yauch y Hemler, 2000)
PKC	CD53, CD81, CD82, CD151	(Zhang y col., 2001b)
OTRAS PROTEÍNAS		
ADAM2	CD81	(Kaji y col., 2000)
ADAM10	CD81, CD82	(Arduise y col., 2008)
ADAM17		(Gutiérrez-López y col., 2011)
CD36		(Miao y col., 2001)
CD224	CD37, CD81, CD53, CD82	(Le Naour y col., 2006)
CTL1/CD92		(Le Naour y col., 2006)
CTL2		(Le Naour y col., 2006)
EWI-2	CD63, CD81, CD82, CD151	(Stipp y col., 2001)
EWI-F	CD81	(Charrin y col., 2001)
Hem-1		(Le Naour y col., 2006)
TADG-15		(Le Naour y col., 2006)
Syntaxinas 3 y 4A		(Le Naour y col., 2006)

Tabla 1: Moléculas asociadas a CD9.

La tetraspanina CD9 también está implicada en el proceso de extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia los sitios de infección e inflamación. Este proceso implica una interacción dinámica entre los leucocitos y el endotelio, que es mediada por multitud de

proteínas presentes en la superficie de estas células. Las tetraspaninas que se encuentran en la superficie del endotelio forman TEMs especializados conocidos como plataformas de adhesión endotelial (EAPs - *Endothelial Adhesive Platforms*) que, además de tetraspaninas, contienen moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Barreiro y col., 2005). Estos TEMs producen un aumento de la unión entre las células del endotelio y los receptores que se encuentran en la membrana de los leucocitos. Las tetraspaninas que participan en la formación de estas estructuras especializadas son CD9 y CD151, y están implicadas en la organización espacial de la membrana y en el reclutamiento de ICAM-1, que se asocia preferentemente con CD9, y VCAM-1, que se asocia preferentemente con CD151, en las áreas de contacto con los leucocitos (Barreiro y col., 2008).

Además de interactuar con ICAM-1, CD9 también interacciona con otras moléculas de adhesión de la IgSF, como ALCAM (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*). A través de esta interacción, CD9 regula tanto las interacciones en trans homofílicas de ALCAM como las interacciones heterofílicas de ALCAM con CD6. Esta regulación se produce mediante un doble mecanismo: 1. CD9 favorece el agrupamiento de las moléculas de ALCAM, aumentando su avidéz; y 2. CD9 inhibe a la enzima responsable del corte de ALCAM, ADAM17, con el consiguiente aumento de la expresión de ALCAM en la membrana celular (Gilsanz y col., 2013; Gutiérrez-López y col., 2011; Yáñez-Mó y col., 2011).

CD9 participa en la regulación de la señalización producida por factores de crecimiento. Concretamente, esta tetraspanina se asocia con tres proteínas diferentes que son capaces de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*): pro-HB-EGF, pro-TGF- α y pro-anfiregulina (Inui y col., 1997; Nakamura y col., 1995; Shi y col., 2000). CD9 aumenta la señalización yuxtacrina mediada por HB-EGF puesto que, aunque no altera los niveles de expresión de esta molécula en membrana, produce un aumento del número de sitios de unión efectivos (Yáñez-Mó y col., 2001).

La tetraspanina CD9 también participa en la organización del citoesqueleto de actina a través de varios mecanismos: I. CD9, como CD82, es capaz de unirse y reclutar en los TEMs a isoformas convencionales de PKC, que son responsables de la regulación del citoesqueleto de actina, (Zhang y col., 2001a); II. CD9 y CD81 se asocian directamente con las proteínas EWI-2 y EWI-F. Estas proteínas son capaces de unirse, también directamente, con proteínas de la familia de las ERM (ezrina, radixina y moesina), que son las moléculas principales de la conexión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto (Sala-Valdés y col., 2006). De esta forma, CD9 estaría regulando, a través de la organización del citoesqueleto de actina, funciones como la adhesión, la migración y la polarización celular.

INTEGRINAS

Introducción

Las integrinas son una familia de receptores de transmembrana heterodiméricos, compuestos por una subunidad α y una β , que participan en una gran variedad de procesos celulares como la adhesión, la migración, la diferenciación y la supervivencia celular (Harburger y Calderwood, 2009; Morse y col., 2014). Estas proteínas se describieron inicialmente como una familia de receptores integrales de membrana que unen el citoesqueleto de la célula con la matriz extracelular (Hynes, 1987). Las integrinas se encuentran exclusivamente en metazoos, puesto que no se han encontrado homólogos en procariotas, hongos o plantas (Hynes, 2002). En mamíferos se han descrito 24 integrinas diferentes, que se obtienen de la combinación de 18 subunidades α con 8 subunidades β (**Figura 6**) (Hynes, 2002; Kinashi, 2005).

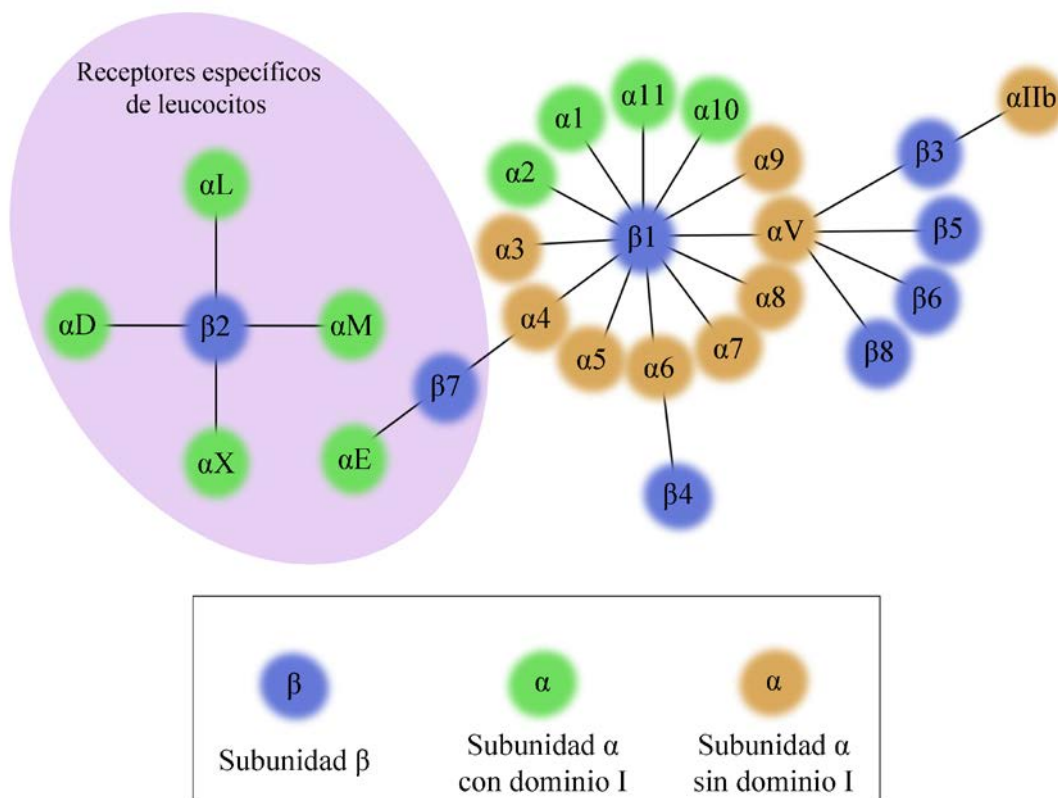


Figura 6: Esquema de las proteínas que componen la familia de las integrinas en mamíferos. Se encuentran representadas las 24 posibles combinaciones entre las subunidades β (círculos azules) y las subunidades α (círculos verdes y marrones). Las subunidades α que presentan un dominio I están representadas por círculos verdes. Las integrinas que se encuentran sólo en células leucocitarias están marcadas con un fondo morado (modificado de Niu y Chen, 2011).

Las integrinas se pueden clasificar de varias formas: en función de la especificidad de ligando (que está determinada por la subunidad α) o en función de la subunidad β que las compone. Según la subunidad β las integrinas se pueden clasificar en 4 subfamilias: I. La subfamilia $\beta 1$ que está compuesta por 12 miembros que se unen principalmente a proteínas de la matriz extracelular; II. La subfamilia $\beta 2$ que está formada por 4 miembros que se expresan exclusivamente en leucocitos; III. La subfamilia $\beta 3$, formada por 2 miembros, que se conocen como citoadhesinas; y IV. La subfamilia $\beta 7$ que se expresan en linfocitos y que también está formada por dos integrinas (Hynes, 1992).

Si se clasifican las integrinas en función de la especificidad de unión al ligando obtenemos los siguientes grupos: a) las integrinas que reconocen en sus ligandos la secuencia RGD (integrinas $\alpha 5$, $\alpha 8$, αV y αIIb) que se encuentra, por ejemplo, en la fibronectina y en la vitronectina; b) las que son capaces de unirse a la laminina ($\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$); c) aquellas integrinas que son capaces de reconocer distintos tipos de colágeno ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ y $\alpha 11$); d) las integrinas que se expresan únicamente en leucocitos (αL , αM , αX , αD y αE); y e) las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha 9\beta 1$ que reconocen un motivo llamado LDV y se unen tanto a proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina, como a receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como VCAM-1 (Humphries y col., 2006; Hynes, 2002; Plow y col., 2000).

La distribución de las integrinas varía mucho en función del tipo celular. Existen integrinas que se encuentran en un único tipo celular, como la integrina plaquetaria $\alpha IIb\beta 3$, y otras cuya expresión está restringida a un conjunto concreto de tipos celulares, como las cuatro integrinas de la subfamilia $\beta 2$, que únicamente se expresan en células leucocitarias. Sin embargo, otras integrinas están presentes en multitud de tipos celulares como la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Staunton y col., 2006).

Estructura

Las integrinas son proteínas de transmembrana que están constituidas por una subunidad α (120-180 kDa) y una subunidad β (90-110 kDa), asociadas entre sí de forma no covalente (**Figura 7**). Tanto las cadenas α como las β de las integrinas presentan un dominio extracelular grande que participa en la interacción con ligandos de la matriz extracelular o de la superficie de otras células, una única región transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático (con la excepción del de $\beta 4$, que tiene un dominio citoplasmático largo) que media la adhesión con el citoesqueleto y con proteínas adaptadoras y señalizadoras (Morse y col., 2014).

- A) Subunidad α : Todas las subunidades α de las integrinas presentan, en el extremo N-terminal, una serie de siete secuencias (cada una comprende de 50 a 60 aminoácidos) con homología entre sí. Esta “repetición” de siete secuencias se pliega formando el

dominio denominado “propulsor- β ” (*β -propeller*). En las últimas 4 secuencias repetidas (o sólo en las tres últimas en algunas integrinas) se encuentran unos motivos estructurales denominados manos EF (*EF-hand*) que están implicados en la unión de cationes divalentes (Springer, 1997).

De las 18 subunidades α de las integrinas, 9 de ellas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αL , αM , αX , αD y αE) contienen un dominio I (*Inserted*) (αI), de unos 200 aminoácidos, que se encuentra insertado entre las repeticiones 2 y 3 del dominio *β -propeller* (Niu y Chen, 2011). Este dominio αI está siempre implicado en la unión de la integrina a su ligando. En el caso de las integrinas que no poseen dominio αI , la región de la subunidad α que participa en la unión al ligando es el dominio *β -propeller* (Carman y Springer, 2003).

En el dominio extracelular de la subunidad α , a continuación del dominio *β -propeller*, están situados los dominios *Thigh* (“cadera”), *Calf-1* y *Calf-2* (“muslos”), que participan en el plegamiento de la integrina (Hynes, 2002).

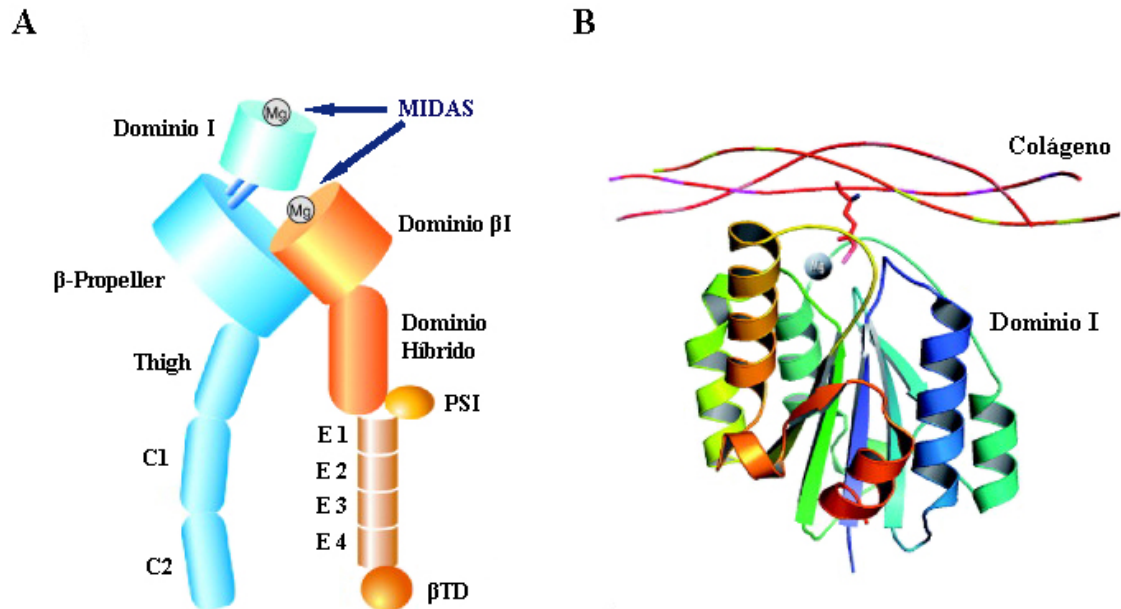


Figura 7: Estructura de las integrinas. A) Esquema de la estructura extracelular de una integrina con dominio I. La subunidad α presenta un dominio I insertado entre las repeticiones 2 y 3 del dominio *β -propeller*. Esta subunidad también presenta otros 3 dominios formados por láminas β que se conocen como *Thigh* y *Calf-1* (C1) y *Calf-2* (C2). La subunidad β está formada por el dominio βI (o *I-like*) que está insertado en el dominio híbrido, el dominio PSI, los cuatro dominios similares a EGF (E1-E4) y el dominio β -terminal (βTD). Ambas subunidades presentan además un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (no representados). Las flechas azules representan los motivos MIDAS de los dominios I y βI implicados en la unión al ligando. B) Representación de la estructura cristalizada del dominio I de la integrina $\alpha 2\beta 1$. El colágeno, a través de un residuo de glutamato, se une a esta integrina por el motivo MIDAS del dominio I (modificado de Staunton y col., 2006).

B) Subunidad β : Teniendo en cuenta su estructura tridimensional, la subunidad β presenta un dominio similar en estructura al dominio αI , denominado dominio βI o *I-like*, en la

región extracelular más alejada de la membrana plasmática. Este dominio está formado por plegamientos establecidos mediante puentes disulfuro y se encuentra insertado en el dominio híbrido. El resto de la subunidad β está compuesto por el dominio PSI (*Plexin-Semaphorin-Integrin*) y por cuatro dominios conocidos como *EGF-like domains*, que reciben este nombre porque están formados por repeticiones ricas en cisteínas que presentan homología con los módulos del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Estas repeticiones son importantes para dar rigidez a la estructura terciaria de la integrina y, junto con el dominio PSI, han sido implicadas en la regulación de la activación de las integrinas. Finalmente, en la parte carboxilo terminal del dominio extracelular se encuentra el dominio terminal β o β TD (*β -terminal domain*) (Luo y col., 2007; Staunton y col., 2006).

Tanto el dominio α I como el dominio β I contienen motivos discontinuos MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*) o sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (Lee y col., 1995; Luo y col., 2007). En las integrinas que poseen el dominio α I, la interacción con el ligando está mediada por el motivo MIDAS de este dominio. Cuando las integrinas no tienen dominio α I, éstas se unen a su ligando a través del motivo MIDAS de la subunidad β (β I) y del dominio *β -propeller* de la subunidad α . (Hynes, 2002).

Los dominios citoplasmáticos de ambas subunidades son muy cortos (alrededor de 50 aminoácidos), excepto el de la subunidad β 4 que tiene un dominio citoplasmático muy largo (1088 aminoácidos), pero son esenciales en la modulación de la afinidad de las integrinas, la unión con el citoesqueleto y en la señalización intracelular (Hynes, 2002). Las colas citoplasmáticas de las subunidades α presentan muy poca similitud entre ellas, sin embargo, las colas de las subunidades β están muy bien conservadas y presentan mecanismos muy similares de regulación (Morse y col., 2014). En la región más próxima a la membrana las colas citoplasmáticas se encuentran unidas por un puente salino que se establece entre un residuo de arginina de la subunidad α y un residuo de aspártico de la subunidad β . Además, a esta unión también contribuyen los residuos hidrofóbicos que se encuentran en la zona amino terminal de los residuos de arginina y aspártico. Esta unión de las colas citoplasmáticas tiene que romperse para permitir el cambio conformacional de las integrinas que da lugar a su activación (Hughes y col., 1995).

En las colas citoplasmáticas se encuentran algunas secuencias conservadas muy importantes. En las subunidades α la secuencia GFFKR regula cambios en la afinidad y, por lo tanto, cambios en el estado de activación de las integrinas (Hynes, 2002). La región adyacente a esta secuencia regula la activación de las integrinas inducida por los ésteres de forbol como el PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) (Weber y col., 1997). Además, la cola citoplasmática de la subunidad α contribuye a la activación de las integrinas específica de tipo celular regulando la

conformación de la cola citoplásmica de la subunidad β y su asociación con proteínas activadoras, de forma que si se eliminan los residuos posteriores al motivo GFFKR se inhibe la adhesión específica de las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta a$ y $\alpha L\beta 2$ (Calderwood, 2004). En la subunidad β se encuentra los motivos conservados NPxY (próximo a la membrana) y NxxP (situado más alejado de la membrana) que también son necesarios para la regulación de la activación de las integrinas. Mutaciones en estos motivos impiden la unión de proteínas del citoesqueleto y señalizadoras a las colas citoplasmáticas de esta subunidad de las integrinas (Liu y col., 2000; Morse y col., 2014; Moser y col., 2009).

Activación de las integrinas

Las integrinas pueden activarse mediante estímulos procedentes del medio extracelular o por estímulos intracelulares. La unión de proteínas citoplasmáticas a las colas de las integrinas puede producir el cambio en la afinidad de las integrinas frente a ligandos extracelulares (señalización desde dentro hacia fuera o *inside-out*). Por otro lado, la unión de ligandos extracelulares a las integrinas puede desencadenar una señalización intracelular (señalización desde fuera hacia dentro o *outside-in*).

Muchas de las integrinas no se encuentran constitutivamente activas si no que pueden estar expresadas en la superficie celular en una forma inactiva en la que no se unen a sus ligandos y, por lo tanto, no transmiten señales. Un estímulo externo puede hacer que las integrinas cambien a una forma de alta afinidad en un evento rápido y reversible (Luo y col., 2007). Este proceso es muy importante para el desarrollo de las funciones biológicas y su importancia es muy evidente en el caso de las integrinas que expresan las células que circulan por el torrente sanguíneo. Un ejemplo es la integrina $\alpha IIb\beta 3$, que es la integrina más expresada en plaquetas y que se encuentra inactiva en las plaquetas que circulan por el torrente sanguíneo. Si esta integrina no se encontrase inactiva las plaquetas podrían unirse a su ligando en el plasma (fibrinógeno) y agregarse produciendo una trombosis (Hynes, 2002). Lo mismo ocurre en el caso de las integrinas de la subfamilia $\beta 2$ que se encuentran inactivas en las células leucocitarias que circulan por la sangre. Cuando estas células reciben señales activadoras, por ejemplo mediante citoquinas y/o quimiocinas, las integrinas $\beta 2$ se activan y se unen a sus moléculas ligando, como los ICAMs. Estas moléculas se expresan en las células endoteliales y sus niveles aumentan notablemente en condiciones de inflamación, permitiendo la unión de los leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos o a otras células, promoviendo su extravasación y participación en procesos como la fagocitosis, la citotoxicidad celular o la colaboración entre linfocitos (Hynes, 2002; Morse y col., 2014).

La capacidad de unión de las integrinas a sus ligandos, y por tanto su capacidad de mediar la adhesión celular, puede ser regulada por dos mecanismos distintos: mediante cambios en la afinidad de la integrina por su ligando y/o en la agregación de las integrinas en la membrana celular, que condiciona su avidéz (Carman y Springer, 2003; Stewart y Hogg, 1996) (**Figura 8**).

- A) Afinidad: Los cambios en la afinidad de la integrina por su ligando se producen mediante cambios conformacionales de las integrinas que afectan al sitio de unión al ligando, de forma que se facilita o se impide la interacción integrina-ligando (Bassani y Cingolani, 2012; Chan y col., 2003). En el estado de baja afinidad por sus ligandos, las integrinas se encuentran en una conformación inactiva en la que las colas citoplasmáticas de las subunidades α y β interaccionan entre sí y sus dominios extracelulares se encuentran plegados (en forma de V) desfavoreciendo la interacción con el ligando, puesto que la zona de unión al ligando queda próxima a la membrana celular. Para pasar a un estado de afinidad intermedia las integrinas tienen que desplegarse, adquiriendo una conformación estirada, en la que queda expuesto el sitio de interacción con el ligando (MIDAS). Finalmente, para adquirir un estado de alta afinidad por sus ligandos, debe ocurrir la rotura de la interacción de las colas citoplasmáticas, produciéndose su separación. Este cambio en la región intracelular se transmite a la región extracelular provocando, en el caso de las integrinas cuya subunidad α no posee dominio I, que la hélice carboxilo-terminal (hélice α -7) del dominio β I se desplace, produciendo a su vez un movimiento lateral de 60° del dominio híbrido. Este movimiento provoca que las integrinas adquieran una conformación abierta de mayor afinidad por el ligando, debido a la reorganización en el motivo MIDAS. Cuando las integrinas contienen un dominio α I, la activación de las mismas requiere un paso adicional. En este caso, es necesario un residuo de glutámico presente en la hélice α -7 del dominio α I. Este glutámico actúa como un ligando intrínseco uniéndose al motivo MIDAS del dominio β I. De este modo, cuando las colas citoplasmáticas se separan, el movimiento de la hélice α -7 del dominio β I provoca el desplazamiento de la hélice α -7 del dominio α I, produciendo la reorganización del motivo MIDAS de este dominio, de forma que adquiere una conformación abierta de mayor afinidad por el ligando (Carman y Springer, 2003; Kim y col., 2003; Luo y col., 2007) (**Figura 8A**).

Proteínas citoplasmáticas como la talina o las kindlinas, que se unen a los motivos NPxY y NxxY de la cola citoplasmática de la subunidad β respectivamente, son capaces de romper las interacciones que existen entre las colas citoplasmáticas de las subunidades α y β favoreciendo su separación y, por consiguiente, la activación de las integrinas. Otras proteínas como la filamina, Dock-1 (*Dedicator Of CytoKinesis-1*) e

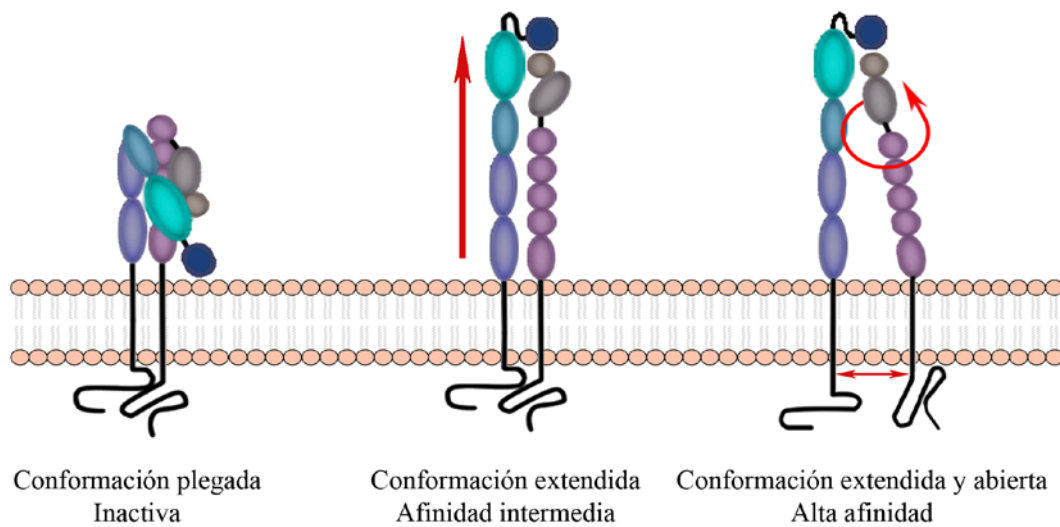
ICAP-1 (*Integrin Cytoplasmic domain-Associated Protein-1*), compiten con la talina para unirse a la subunidad β inhibiendo así la activación de las integrinas (Harburger y Calderwood, 2009; Morse y col., 2014).

Algunas integrinas como $\alpha L\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 7\beta 1$ presentan, en determinadas ocasiones, el estado de activación intermedio que parece limitar su repertorio de ligandos a aquellos con los que tienen mayor afinidad de interacción. Este estado de activación permitiría algunas funciones celulares como la unión y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio (Staunton y col., 2006).

- B) Avidez: Las integrinas también pueden aumentar la interacción con sus ligandos mediante la agrupación (*clustering*) de moléculas de integrina en la membrana, sin producirse cambios en la afinidad, proceso que se conoce como regulación de la avidéz. Los ligandos de las integrinas poseen generalmente naturaleza multivalente que permite la agrupación de las integrinas, aumentando su densidad en determinados puntos de la membrana. Este incremento de la densidad de receptores en la membrana permite establecer un mayor número de conexiones con el ligando aumentando la adhesión y señalización de las integrinas (Staunton y col., 2006). Estos agrupamientos se producen mediante la participación directa del citoesqueleto, ya que es necesario que se reduzcan transitoriamente las interacciones de las integrinas con el citoesqueleto (*cytoskeletal restraints*) para que éstas se puedan agregar (Bassani y Cingolani, 2012; Carman y Springer, 2003; van Kooyk y Figdor, 2000).

La activación de las integrinas se puede inducir de manera artificial en el laboratorio. Se puede regular la afinidad de las integrinas mediante el uso de cationes divalentes, como el magnesio o el manganeso que inducen la conformación activa de las integrinas (Carman y Springer, 2003; Dransfield y col., 1992b). También se puede modificar la afinidad de las integrinas usando anticuerpos monoclonales que estimulen de forma específica la molécula, mediante su unión a las subunidades α o β , cambiando su conformación hacia un estado de alta afinidad por sus ligandos (Arroyo y col., 1993). Por otro lado, también se puede aumentar la agrupación de las integrinas en la membrana, es decir la avidéz, usando ésteres de forbol como el PMA que aumenta la capacidad de difusión de las integrinas en la membrana plasmática en presencia de ligando. El PMA no sólo aumenta la difusión de las moléculas de integrina, sino que además es capaz de inducir el estado de afinidad intermedia (Carman y Springer, 2003; Kim y col., 2004). También se pueden crear agrupamientos de integrinas usando un anticuerpo secundario que haga de puente entre varios anticuerpos primarios dirigidos frente a alguna de las subunidades de las integrinas.

A) Regulación de la afinidad



B) Regulación de la aidez

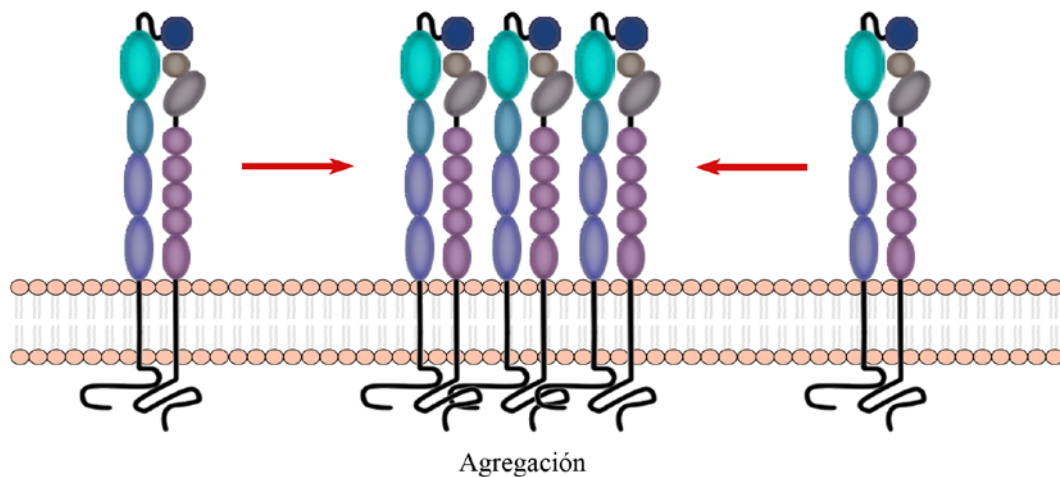


Figura 8: Mecanismos de regulación de las integrinas. Las integrinas pueden ser reguladas mediante cambios en su afinidad o en su estado de agregación. **A)** El panel de arriba muestra las distintas conformaciones que puede tener una integrina: una conformación plegada, que posee baja afinidad por el ligando; una conformación estirada, que presenta una afinidad intermedia y, finalmente, una conformación estirada y con las colas citoplasmáticas separadas, que presenta una alta afinidad por el ligando. Las flechas rojas indican los cambios conformacionales que se producen en las integrinas: estiramiento de la integrina en el estado de afinidad intermedia y separación de las colas citoplasmáticas y giro del dominio híbrido en la conformación de alta afinidad. **B)** El panel inferior muestra la regulación de las integrinas mediante su agregación en la superficie de la célula, lo que provoca que se produzca un aumento de las interacciones con el ligando. Este proceso se conoce como regulación de la aidez de las integrinas.

Funciones

Los efectos de la eliminación de la expresión de las integrinas en ratones son diferentes en función de la integrina estudiada, lo que refleja que cada integrina tiene un papel concreto. Los fenotipos de estos ratones son muy variados pudiendo provocar un bloqueo completo del desarrollo preimplantacional ($\beta 1$), defectos graves en el desarrollo ($\alpha 4$, $\alpha 5$, αV y $\beta 8$), mortalidad perinatal ($\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 8$, αV , $\beta 4$ y $\beta 8$), defectos en la función de los leucocitos (αL , αM , αE , $\beta 2$ y $\beta 7$), en la inflamación ($\beta 6$), en la hemostasia (αIIb , $\beta 3$ y $\alpha 2$), en la remodelación de los huesos ($\beta 3$) o en la angiogénesis ($\alpha 1$ y $\beta 3$) (Hynes, 2002; Sheppard, 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, las integrinas sirven como uniones entre las proteínas extracelulares y el citoesqueleto. La unión de los dominios extracelulares de las integrinas a la matriz extracelular o, en otros casos, a sus ligandos en otras células, mantiene la adhesión celular y es crucial para el desarrollo embrionario, el mantenimiento y reparación de los tejidos, la defensa frente a agentes externos y la hemostasia (Harburger y Calderwood, 2009). Por otro lado, los dominios citoplasmáticos de las integrinas, exceptuando $\alpha 6\beta 4$, se unen al citoesqueleto mediante su asociación a las proteínas talina, filamina y α -actinina que son capaces de unirse directamente a los microfilamentos de actina. La subunidad $\beta 4$ posee un dominio citoplasmático mucho más largo y puede establecer conexiones con los filamentos intermedios (Legate y col., 2009; Morse y col., 2014). La unión de las integrinas al citoesqueleto produce una gran variedad de señales intracelulares que permiten controlar varios procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la forma, la polaridad, la migración, la adhesión y la diferenciación celular (Calderwood y col., 2000; Harburger y Calderwood, 2009).

Las integrinas ejercen un papel fundamental en los procesos de migración y adhesión de las células sobre los componentes de la matriz extracelular. Las uniones de las células a la matriz extracelular son extremadamente dinámicas y heterogéneas con respecto a su forma y composición. Las más grandes se conocen como adhesiones focales y sus principales componentes estructurales son la talina, la vinculina y la actina (Calderwood y col., 2000). Las adhesiones se forman inicialmente en el frente de avance de la célula en migración, en una región conocida como lamelipodio. Estas adhesiones iniciales son pequeñas y transitorias, con tiempos de vida muy cortos y están compuestas de moléculas de adhesión, como las integrinas que se agrupan en el punto de adhesión, moléculas de unión al citoesqueleto, como talina, vinculina y α -actinina, y moléculas señalizadoras como FAK (*Focal Adhesion Kinase*), Src o PKC. En estas regiones de adhesiones nacientes se produce una activa polimerización de actina (Calderwood y col., 2000; Legate y col., 2009; Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011). Cuando las adhesiones se aproximan a la parte final del lamelipodio de la célula en migración, que es una zona de desensamblaje de actina, las adhesiones tienen que desensamblarse o crecer. El

proceso de maduración de las adhesiones es un proceso largo donde las adhesiones permanecen en el sitio mientras que la célula se mueve sobre ellas. La mayoría de las proteínas que participan en las etapas iniciales de la formación de adhesiones focales también forman parte de las adhesiones maduras o adhesiones fibrilares, aunque su distribución en la adhesión es diferente. También aparecen componentes nuevos en las adhesiones maduras como la tensina. Para el desensamblaje de las adhesiones, en el extremo final de la célula, las adhesiones se mueven de forma centrípeta y se desensamblan dejando restos de integrinas en el sustrato (Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011).

Las integrinas intervienen en la adhesión de los leucocitos al endotelio y en su trans migración. En estos procesos son esenciales las integrinas de la subfamilia $\beta 2$ pero también la integrina $\alpha 4 \beta 1$. En una primera fase se tiene que producir la “captura” de los leucocitos circulantes por el endotelio y, cuando ocurren estos primeros contactos, los leucocitos comienzan a rodar sobre el endotelio. Este proceso es mediado por la L-selectina del leucocito y por las E- y P-selectinas del endotelio (Gahmberg y col., 1999). El siguiente paso es la activación de las integrinas $\alpha L \beta 2$ y $\alpha 4 \beta 1$ por las quimioquinas generadas por los tejidos lesionados. Esta activación provoca una adhesión firme del leucocito al endotelio mediante la unión de estas integrinas a sus ligandos (ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente). La activación de estas integrinas permite, en un paso posterior, que la célula adherida al endotelio pueda migrar a través de él, en un proceso que es conocido como diapédesis (Morse y col., 2014). La diapédesis se realiza gracias a la formación de estructuras dinámicas ricas en integrinas en la superficie de avance de la célula leucocitaria. Además, en el endotelio adyacente también se forman nanodominios de membrana (EAPs) ricos en ICAM-1 y VCAM-1 que están regulados por tetraspaninas (resumido en el apartado de la tetraspanina CD9) (Barreiro y col., 2005; Barreiro y col., 2008). Los neutrófilos se diferencian del resto de los leucocitos en este proceso puesto que, aunque usan la integrina $\alpha L \beta 2$ para adherirse al endotelio, es la integrina $\alpha M \beta 2$ la que permite la migración a través de éste (Morse y col., 2014).

Otro proceso celular en el que intervienen las integrinas es la fagocitosis. En este caso, las integrinas leucocitarias $\alpha M \beta 2$ y $\alpha X \beta 2$ promueven la fagocitosis de microbios opsonizados por el fragmento iC3b del complemento que serán almacenados en fagosomas para ser destruidos (Dupuy y Caron, 2008). Al igual que en los ejemplos anteriores, estas integrinas requieren señales estimuladoras extracelulares para iniciar la fagocitosis, que pueden provenir de quimioquinas, citoquinas o productos bacterianos (Aderem y Underhill, 1999).

Las integrinas también controlan la supervivencia celular a través de distintas rutas de señalización como la ruta PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*)/AKT/Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). La supervivencia dependiente de la señalización mediada por integrinas protege a las células de determinados tipos de estrés como el causado por la ausencia de factores de crecimiento. De

esta forma, si se bloquea la integrina $\alpha 4\beta 1$ se puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales a drogas citotóxicas (Staunton y col., 2006).

La integrina leucocitaria LFA-1

La subunidad $\beta 2$ de las integrinas se puede combinar con cuatro subunidades α formando una subfamilia de integrinas que sólo se encuentran en leucocitos: $\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18 o LFA-1), que se expresa en la mayoría de los leucocitos; $\alpha M\beta 2$ (CD11b/CD18, Mac-1 o CR3), en neutrófilos, monocitos, macrófagos y células NK (*Natural Killer*); $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18, p150,95 o CR4), en monocitos, macrófagos, células NK y células dendríticas; y $\alpha D\beta 2$ (CD11d/CD18), en monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Las integrinas de esta subfamilia desempeñan varias funciones claves: intervienen en la extravasación de los leucocitos, en la fagocitosis, en la colaboración entre los linfocitos y en la respuesta a las infecciones (Gahmberg y col., 1999).

La integrina LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) es un receptor de adhesión específico de leucocitos que coordina la adhesión y la señalización en procesos fundamentales del sistema inmune (van Kooyk y col., 1999). LFA-1, mediante la unión a sus ligandos específicos, las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1, -2, -3, -4 y -5 y JAM-A (*Junctional Adhesion Molecule-A*), regula diversos procesos que requieren adhesión intercelular como la extravasación a tejidos, la organización de la sinapsis inmunológica y la presentación de antígenos, la colaboración entre linfocitos y la muerte mediada por linfocitos citotóxicos (Anikeeva y col., 2005; Hogg y col., 2003; Ostermann y col., 2002; Springer y col., 1987).

La primera función que se describió de la integrina LFA-1 fue su participación en la muerte celular mediada por linfocitos T citotóxicos y por células NK, ya que anticuerpos monoclonales bloqueantes de la función de esta integrina inhibían la muerte celular producida por estos linfocitos. Estos anticuerpos bloqueaban la formación de conjugados entre los linfocitos T citotóxicos y las células diana, e incluso separaban los complejos ya formados (Springer y col., 1987).

LFA-1, además de participar en la adhesión de los leucocitos al endotelio y en la trans migración (ver apartado de funciones de integrinas), participa en el proceso de presentación del antígeno. Durante el proceso de presentación antigénica, el complejo TCR/CD3 (*T-Cell Receptor*) del linfocito T interacciona con el MHC cargado de péptido antigénico (MHC-p) de una célula presentadora de antígeno. Cuando se produce el reconocimiento del antígeno se desencadena una redistribución de moléculas en la zona de contacto entre los dos tipos celulares que da origen a la sinapsis inmunológica (Dustin, 2008). En el proceso de formación de la sinapsis inmune, LFA-1 se une muy pronto a su ligando ICAM-1 y permite la estabilización y

maduración de la sinapsis. En la zona central (c-SMAC) de la sinapsis inmune se encuentra el complejo TCR/CR3 unido al MHC-p de la célula presentadora. Esta región central se encuentra rodeada por un anillo periférico (p-SMAC – *peripheral* SMAC) en el que se encuentra LFA-1 interaccionando con ICAM-1. Este anillo formado por LFA-1 es muy importante porque impide el acceso de la fosfatasa CD45 a la zona central de la sinapsis, permitiendo que se mantenga la señalización ya que evita la defosforilación de quinasas claves como ZAP-70 (Evans y col., 2009). Además, la unión de LFA-1 a su ligando aumenta la proliferación y la producción de citoquinas mediada por el TCR (Staunton y col., 2006). Los linfocitos B también forman sinapsis inmunológicas cuando se encuentran con sus antígenos. En este caso la unión de LFA-1 con su ligando ICAM-1 en el anillo periférico reduce la afinidad de unión entre el BCR (*B-Cell Receptor*) y su antígeno, lo que es necesario para la activación del linfocito B (Carrasco y col., 2004).

COMPLEJOS INTEGRINA/TETRASPANINA

Distintos estudios bioquímicos (ver Tabla I) y funcionales han puesto de manifiesto la importancia de las interacciones entre las tetraspaninas y las integrinas. Desde que se describió la interacción de la tetraspanina CD9 con la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ en plaquetas (Slupsky y col., 1989), se han identificado muchos otros complejos tetraspanina-integrina. La asociación de algunas tetraspaninas con determinadas integrinas (como las integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$) se puede observar en casi todos los tipos celulares en los que están presentes las dos moléculas, sin embargo, otras integrinas (como $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$) forman complejos con las tetraspaninas sólo en tipos celulares concretos (Berditchevski, 2001).

La mayoría de las interacciones entre tetraspaninas e integrinas ocurren cuando ya está formado el heterodímero entre la subunidades α y β de las integrinas (Berditchevski, 2001), aunque algunas de las interacciones entre tetraspaninas e integrinas ocurren en etapas tempranas de la biosíntesis, y parece que ayudan a la maduración y a la expresión en la superficie celular de los receptores de integrina. Éste es el caso de la interacción de CD151 con las subunidades de integrinas $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$. Además, CD151 también regula la internalización de algunas moléculas de integrina como $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$, regulando así la migración celular dependiente de estas integrinas (Bassani y Cingolani, 2012).

Se han descrito muchos ejemplos en los cuales diversas tetraspaninas regulan la adhesión y migración dependiente de las integrinas, como el descrito anteriormente de los complejos tetraspanina- $\alpha 3\beta 1$ (Yáñez-Mó y col., 2001). Pero las tetraspaninas no sólo regulan esta adhesión sino que además, los complejos formados por las tetraspaninas también pueden regular la señalización mediada por las integrinas. La contribución de las tetraspaninas a la señalización dependiente de la adhesión puede deberse a su habilidad de reclutar ciertas moléculas de señalización en los TEMs. Por ejemplo, las tetraspaninas CD9, CD53, CD81, CD82 y CD151 pueden asociarse con dos miembros de la familia de PKC (α y βII) y reclutarlos en los complejos de integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$. La fosforilación de la subunidad $\alpha 3$ de la integrina dependiente de PKC es fundamental para la migración celular y para la señalización dependiente de la adhesión de $\alpha 3\beta 1$ (Berditchevski, 2001).

La importancia de la interacción entre las tetraspaninas y las integrinas se ve reflejada en procesos tan importantes como el desarrollo tumoral o la metástasis. En este contexto, CD151 parece favorecer el crecimiento tumoral y la metástasis de varios tipos de tumores mediante su interacción con las integrinas $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ (Devbhandari y col., 2011; Hemler, 2014).

Como se ha comentado anteriormente, las tetraspaninas también están implicadas en la regulación de las integrinas en los leucocitos. Por ejemplo, las tetraspaninas CD151 y CD9 reclutan a integrinas $\beta 1$ en conformación de alta afinidad en la sinapsis inmunológica (Rocha-

Perugini y col., 2014). Además, las tetraspaninas se asocian con las integrinas α L β 2, α 4 β 1 y α 5 β 1 regulando así la movilidad de los leucocitos y su adhesión a la matriz extracelular o al endotelio (Yáñez-Mó y col., 2001). Se ha observado que la transfección de una línea celular de linfocitos B con la tetraspanina CD9 provoca alteraciones en la motilidad celular que es dependiente de las integrinas α 4 β 1 y α 6 β 1 (Shaw y col., 1995).

Por otro lado, las interacciones entre estas moléculas también son importantes en las funciones cerebrales. La interacción de CD9 y CD81 con las integrinas α 3 β 1 y α 6 β 1 es muy importante para el crecimiento de las neuritas (Bassani y Cingolani, 2012).

En resumen, la tetraspanina CD9 interacciona y regula a varios miembros de la subfamilias de integrinas β 1 (α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 4 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1 y α 7 β 1), β 3 (α IIb β 3) y β 4 (α 6 β 4) en distintos tipos celulares. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la existencia de una interacción funcional entre la tetraspanina CD9 con algún miembro de la subfamilia β 2 de las integrinas. Existe un estudio previo realizado por Takeda y col. donde se describe una posible interacción entre CD9 y la subunidad β 2 de las integrinas basándose en un resultado de co-inmunoprecipitación, aunque en este estudio no se describe la naturaleza de la interacción o si esta interacción tiene alguna implicación funcional (Takeda y col., 2003). Por otro lado, sí se han descrito interacciones de las tetraspaninas CD81, que es la tetraspanina más similar a CD9, y CD82 con la integrina leucocitaria LFA-1 en linfocitos T (Shibagaki y col., 1999; VanCompernelle y col., 2001). Por todos estos datos se decidió estudiar en esta tesis si CD9 se asocia funcionalmente con la integrina LFA-1.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis es investigar si existe una interacción entre la tetraspanina CD9 y la integrina leucocitaria LFA-1 (α L β 2) y los efectos reguladores que podría ejercer CD9 sobre algunos de los procesos que esta integrina controla en células leucocitarias. Este objetivo general se puede dividir en los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar si existe una interacción entre CD9 y LFA-1 en la superficie de distintos tipos de células leucocitarias.
2. Analizar si la interacción que se produce entre estas dos proteínas es de naturaleza directa o indirecta.
3. Investigar los efectos reguladores de CD9 sobre la capacidad adhesiva y citotóxica dependiente de LFA-1.
4. Estudiar si los mecanismos implicados en la regulación de la adhesión de LFA-1 por la tetraspanina CD9 se deben a cambios en la afinidad y/o en la avidéz de esta integrina.



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares.

Los leucocitos mononucleares humanos se obtuvieron por aislamiento a partir de concentrados de células sanguíneas (*buffy coats*) procedentes de donantes sanos (proporcionados por el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid) mediante centrifugación en gradiente de densidad (Biocoll – Biochrom). Los monocitos se eliminaron por sedimentación en placas de cultivo durante 30 minutos a 37 °C. Las células que permanecieron en suspensión se trataron con 5 µg/ml de fitohemaglutinina (Amersham Biosciences) durante 48 horas para inducir la proliferación de los linfocitos y, posteriormente, se cultivaron durante 7-10 días en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) y 50 U/ml de IL-2 (Erocetus) (Mittelbrunn y col., 2009).

Las líneas celulares humanas de linfocitos T (HSB-2 y Jurkat), de linfocitos B (JY y Daudi) y monocíticas (THP-1 y U937) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino.

La diferenciación de las líneas celulares monocíticas THP-1 y U937 hacia células de tipo macrófago se indujo por incubación a 37 °C con 100 ng/ml de PMA durante 24 horas.

Todos los medios se complementaron con 2 mM glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina.

Anticuerpos y reactivos.

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado diversos anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen la subunidad $\beta 2$ de las integrinas: el anticuerpo MEM-48 (ImmunoTools) que está unido a biotina; los anticuerpos inhibidores de la actividad de las integrinas $\beta 2$ Lia3/2 (Gordon-Alonso y col., 2006) y TS1/18 (Dransfield y col., 1992a); el anticuerpo activador de integrinas $\beta 2$ KIM185 (proporcionado por el Dr. Martyn K. Robinson. UCB-Celltech, Slough, UK) y el anticuerpo m24 que reconoce un epítipo de la subunidad $\beta 2$ que sólo está accesible cuando la integrina está activa (proporcionado por la Dra. Nancy Hogg. Cancer Research UK, Londres, Reino Unido). También se han usado varios anticuerpos frente a la tetraspanina CD9: los AcMs VJ1/20 (Miyake y col., 1991), PAINS10 y PAINS13 (Ho y col., 2006) y el anticuerpo policlonal de conejo CD9 H-110 (Santa Cruz Biotechnology). Otros anticuerpos usados son: los AcM TP1/40 (Gordon-Alonso y col., 2006) y TS1/11 (Dransfield y col., 1992a) que reconocen la subunidad αL de la integrina LFA-1 (CD11a), el AcM Bear-1 (Charrin y col., 2001) que reconoce la subunidad αM (CD11b) y el AcM HC1/1 (Seehafer y col., 1988) que reconoce la subunidad αX (CD11c) de las integrinas. Como control de los distintos experimentos se utilizaron los siguientes AcMs: anti- β -Tubulina (Sigma), anti- β -actina (Sigma), anti-CD147

(VJ1/9), anti-CD59 (VJ1/12) (Miyake y col., 1991), anti-HSPA8 (PAINS18) (Ho y col., 2006), anti-CD81 (5A6) (proporcionado por la Dra. Shoshana Levy. Stanford University School of Medicine, EE.UU.) y anti-CD105 (P4A4) (proporcionado por el Dr. Carmelo Bernabéu. CIB-CSIC, Madrid, España). También se utilizó como control el anticuerpo policlonal de conejo anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).

Los anticuerpos monoclonales disponibles en nuestro laboratorio se purificaron a partir de líquido ascítico mediante cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G (Biovision) en función del isotipo del anticuerpo.

La proteína quimérica ICAM-1-Fc, formada por los cinco dominios de ICAM-1 fusionados a la región Fc de la IgG1 humana, se purificó siguiendo el protocolo descrito previamente por Berendt y col. (Berendt y col., 1992).

Plásmidos y transfecciones.

Las líneas celulares HSB-2 y U937, que no expresan CD9, se transfectaron con 20 µg del plásmido pcDNA3-CD9 (que contiene el cDNA codificante de la tetraspanina CD9) o con el plásmido pcDNA3 vacío como control (Invitrogen). La transfección se realizó mediante electroporación a 200 V (2 pulsos de 10 ms en cubetas de 0,4 cm) en un electroporador (ElectroSquarePorator ECM830. BTX). Las células transfectadas con estos plásmidos se seleccionaron con geneticina (Gibco) a 1 mg/ml y se analizaron por citometría de flujo.

Para producir el silenciamiento de CD9 en la línea celular Jurkat (JK) se utilizaron las siguientes construcciones de shRNA (*short hairpin RNA* o ARN pequeño en horquilla): 1) el plásmido TI356235 que contiene un shRNA específico para el silenciamiento de CD9 (JK shCD9) y 2) el plásmido control TR20003 que no contiene ningún inserto (JK TR2). Estos plásmidos se introdujeron en las células JK mediante infección por retrovirus siguiendo las instrucciones del fabricante (OriGene Technologies). Las células infectadas se seleccionaron con 1 µg/ml de puromicina (Sigma) y se analizaron por citometría de flujo.

Citometría de flujo.

Para el análisis de la expresión de proteínas en la superficie celular, las distintas líneas celulares se lavaron dos veces con RPMI-1640 y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (10 µg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con RPMI-1640, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC - *Fluorescein IsoTioCyanate*) (Sigma), se volvieron a lavar tres veces y se fijaron con 2 % de formaldehído diluido en PBS.

En el caso de las líneas celulares THP-1 y U937, antes de añadir el anticuerpo primario, los receptores Fc de la superficie celular se saturaron con gammaglobulina humana (Sigma) durante 20 minutos a 4 °C.

Para analizar por citometría la inducción de la expresión del epítipo m24, las células HSB-2 y Jurkat (con y sin CD9) se lavaron con tampón HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mg/ml glucosa) y se incubaron 15 minutos a 37 °C con Mn^{2+} (10, 20, 40, 100 and 400 μ M) o con Ca^{2+}/Mg^{2+} (0,5 mM y 1 mM respectivamente) en presencia del AcM m24 (5 μ g/ml). Después las células se lavaron tres veces con tampón HEPES, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC, se volvieron a lavar y se fijaron con 2 % de formaldehído.

En ambos experimentos la intensidad de fluorescencia de las células se analizó en un citómetro de flujo FACScalibur TM (Beckton-Dickinson) y los datos se procesaron con el programa de análisis FlowJo (Tree Star Inc.).

Inmunofluorescencia, microscopía confocal y TIRF.

Con objeto de estudiar la colocación en la membrana plasmática de las subunidades α L y β 2 de la integrina LFA-1 con CD9, las líneas celulares THP-1, THP-1 diferenciadas con PMA, JK o JY se trataron con 0,5 mM de Ca^{2+} / 1 mM de Mg^{2+} o con 0,4 mM de Mn^{2+} durante 20 minutos a 37 °C. Estas células se sembraron en cubreobjetos de cristal de 12 mm recubiertos con 50 μ g/ml de poli-L-lisina (Sigma) y se incubaron 20 minutos a 37 °C. Una vez que las células se adhirieron al cristal, se lavaron una vez con PBS, se fijaron con 2 % de paraformaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5). Para evitar las uniones inespecíficas, las células se incubaron con 1 % BSA (Sigma) en TBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación las muestras se incubaron con 10 μ g/ml del anticuerpo primario TS1/11 (anti- α L), TS1/18 (anti- β 2) o con el anticuerpo control VJ1/9 (anti-CD147) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con 0,1 % BSA en TBS y se tiñeron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo rojo Alexa Fluor-594 (Invitrogen). Después de lavar las muestras tres veces, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal de conejo anti-CD9 (H110), se lavaron con 0,1 % BSA en TBS y se tiñeron 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo verde Alexa Fluor-488 (Invitrogen). Por último, tras lavar tres veces con TBS y hacer un lavado final con H_2O milliQ, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje Mowiol (Calbiochem).

En el caso de la línea celular THP-1, los receptores Fc fueron saturados con gammaglobulina humana antes de la fijación.

Las imágenes se adquirieron con el microscopio invertido Zeiss LSM510 Meta. Los histogramas de colocación y los valores del coeficiente de Pearson se obtuvieron con el programa Fiji y el análisis *Intensity correlation analysis* (Little y col., 2004; Toyo-oka y col., 1999).

Para contar los agrupamientos o *clusters* de $\beta 2$ en la zona de contacto con el ligando ICAM-1, células JK TR2, JK shCD9, U937 pcDNA3 y U937-CD9 estimuladas con PMA (200 ng/ml durante 2 horas a 37 °C), se sembraron en cubreobjetos de cristal de 12 mm recubiertos con 10 μ g/ml de ICAM-1-Fc y se incubaron a 37 °C en tampón HEPES con cationes (0,5 mM Ca^{2+} y 2 mM de Mg^{2+}) durante 90 minutos para permitir su adhesión al cubreobjetos. Estas células se fijaron con 2 % de paraformaldehído y se permeabilizaron con 0,3 % de Tritón-X100 en TBS 3 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con 1 % de BSA y, además, las células U937 se trataron con gammaglobulina humana para saturar los receptores Fc. Posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo primario TS1/18 (10 μ g/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con 0,1 % de BSA en TBS y se incubaron 30 minutos con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa Fluor-555 (Invitrogen). Después se lavaron las muestras y se montaron sobre portaobjetos como se ha descrito anteriormente. Las imágenes se adquirieron con el microscopio invertido Zeiss LSM510 Meta en el plano del eje Z que permitía observar la zona basal de las células donde se produce la unión de la integrina LFA-1 con el ligando. Para cuantificar el número de agrupamientos de $\beta 2$ y el tamaño de los mismos, se analizaron las imágenes con el programa Fiji, estableciendo un umbral de intensidad igual en todas las imágenes para comparar las células que tienen y no tienen CD9.

En la preparación de muestras para la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total o TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), también conocida como microscopía de campo evanescente, se utilizaron células JK TR2 y JK shCD9 activadas con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas. Estas células se sembraron sobre placas Petri de 35 mm con fondo de cristal (250.000 células por placa), que previamente se habían recubierto toda la noche a 4 °C con 14 μ g/ml de ICAM-1-Fc, y se incubaron a 37 °C durante 90 minutos para permitir la adhesión celular. Después de lavar con PBS las células no adheridas, las células adheridas se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS (10 minutos a temperatura ambiente), se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo anti- $\beta 2$ TS1/18 como se ha descrito anteriormente. Las imágenes del plano basal de la célula, zona de interacción de la integrina LFA-1 con su ligando ICAM-1, fueron obtenidas con un microscopio invertido TIRF Olympus Xcellence IX83P2ZF.

Ensayos de hibridación por proximidad (PLAs).

Los experimentos de hibridación por proximidad o PLAs (*Proximity Ligation Assays*) (Duolink kit, Olink Bioscience) permiten detectar la interacción de dos proteínas que se encuentren muy próximas entre sí (≤ 40 nm) mediante microscopía óptica de fluorescencia (Gutiérrez-López y col., 2011; Kaji y col., 2000). Para estos experimentos las células THP-1 se sembraron sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm y se diferenciaron con PMA (24 horas con 100 ng/ml a 37 °C). Estas células se fijaron con 2 % de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos y se añadió medio de bloqueo para evitar posibles interacciones inespecíficas. Después, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente simultáneamente con el anticuerpo anti-CD9 policlonal de conejo (H110) y con los AcMs frente a la subunidad $\beta 2$ (TS1/18) o frente a subunidad αL (TS1/11) de la integrina LFA-1. Como control positivo y negativo de unión a CD9 se utilizaron los AcMs anti-CD81 (5A6) y anti-CD147 (VJ1/9), respectivamente. Las células se lavaron con el tampón suministrado por el fabricante y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios que estaban acoplados a dos oligonucleótidos (la “sonda +” se encontraba unida al anticuerpo anti-IgG de ratón y la “sonda -” al anticuerpo anti-IgG de conejo). Posteriormente, se hibridaron los oligonucleótidos de las dos sondas (durante 30 minutos a 37 °C) mediante la acción de una ligasa, formándose un círculo cerrado. Esta hibridación sólo se produce si las dos proteínas se encuentran a 40 nm o menos de distancia. Después, se añadió la polimerasa (durante 100 minutos a 37 °C) para que tuviese lugar la amplificación por el mecanismo del círculo rodante. Tras la unión, durante el proceso de amplificación, de un oligonucleótido fluorescente, la aparición de fluorescencia en las muestras se observó usando el microscopio invertido Zeiss LSM510 Meta.

Preparación de extractos de proteína y análisis por *western-blot*.

La expresión de CD9 y $\beta 2$ en distintas líneas celulares se analizó mediante la técnica de *western-blot*. Primero se lisaron las células 15 minutos a 4 °C en tampón de lisis Tritón (1 % Tritón-X100; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM PMSF; 0,2 U/ml aprotinina; 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina y 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstanina A en agua). A continuación, los lisados fueron clarificados por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las muestras se prepararon en tampón de carga Laemmli en condiciones no reductoras. A partir de estas muestras de proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 8 % o del 12 % (dependiendo de la proteína a analizar) y, posteriormente, se realizó una transferencia líquida de las proteínas fraccionadas a una membrana de nitrocelulosa (Pall Life Sciences). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora con 3 % BSA en TBS y se incubaron con anticuerpos específicos

para CD9 (VJ1/20-biotina) y para $\beta 2$ (MEM-48-biotina) durante toda la noche en TBS con 0,3 % BSA a la dilución optimizada previamente. Tras lavar las membranas con tampón de lavado (TBS con 0,1 % Tween-20), las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario estreptavidina-HRP (Sigma) durante 1 hora y se volvieron a lavar. El revelado se realizó utilizando el sistema quimioluminiscente de Amersham y la señal quimioluminiscente se visualizó con el lector ImageQuant LAS 4000 mini (GE).

La determinación de la concentración de proteína de los distintos extractos se realizó utilizando el kit “DC protein assay” (Bio-Rad Laboratories) midiendo la absorbancia a 690 nm. Las concentraciones se estimaron a partir de una curva patrón construida con distintas concentraciones de albúmina bovina (Fracción V) preparada en el mismo tampón que los extractos celulares. En algunos experimentos, las bandas obtenidas se cuantificaron mediante densitometría con la ayuda del programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

Para el estudio de la resistencia de las moléculas de LFA-1 a la extracción con distintos detergentes se utilizaron células Jurkat con (JK TR2) o sin (JK shCD9) CD9 estimuladas con 100 ng/ml de PMA durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar las células con PBS, éstas se suspendieron en el tampón de adhesión (20 mM de HEPES pH 7,4; 149 mM NaCl; 2 mg/ml de glucosa; 1 mM $MgCl_2$ y 0,5 mM $CaCl_2$) y se dejaron adherir durante 45 minutos a 37 °C a placas de plástico recubiertas con ICAM-1-Fc a 10 $\mu g/ml$. Una vez adheridas, las células se lisaron con distintas concentraciones de Tritón-X100 (0,02 %, 0,05 %, 0,1 % y 0,5 %). La cuantificación del lisado de proteínas obtenido, la electroforesis, la transferencia y el revelado con los anticuerpos frente a $\beta 2$, CD9 o β -actina se realizó como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas.

Los experimentos de interacción de proteínas se realizaron usando células intactas, es decir, las células se incubaron con el anticuerpo correspondiente antes de lisarlas, para poder detectar las interacciones proteína-proteína que ocurren en la superficie de la célula. Por este motivo, las células THP-1/PMA (diferenciadas con 100 ng/ml de PMA 24 horas a 37 °C) y JY se incubaron 15 minutos a 37 °C con 10 $\mu g/ml$ de los AcMs TS1/18 (anti- $\beta 2$), VJ1/20 (anti-CD9), VJ1/9 (anti-CD147) o VJ1/12 (anti-CD59) en tampón TBS que contenía 0,5 mM $CaCl_2$ y 1 mM $MgCl_2$. Después de lavar las células para eliminar el exceso de anticuerpo, se lisaron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM $CaCl_2$; 1 mM $MgCl_2$ e inhibidores de proteasas) con el detergente Brij-97 o Tritón-X100 al 1 % según el experimento realizado y se centrifugaron los lisados para eliminar el material insoluble. Estos lisados se incubaron toda la noche a 4 °C con proteína G-sefarosa (20 μl por punto). Al día siguiente, se lavó el material inmunoprecipitado 3 veces con tampón de lisis diluido 1/5 y se prepararon las muestras en

tampón de carga Laemmli en condiciones no reductoras. Los complejos inmunoprecipitados se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida del 8 % o del 12 % y se detectó la presencia CD9, β 2, CD147 o CD59, con los anticuerpos VJ1/20-biotina, MEM-48-biotina, VJ1/9 y VJ1/12 respectivamente, por *western-blot* como se ha indicado anteriormente. En el caso de los anticuerpos VJ1/9 y VJ1/12 el anticuerpo secundario que se utilizó fue un anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma).

Experimentos de entrecruzamiento químico (*crosslinking*).

Para los ensayos de entrecruzamiento químico las células THP-1/PMA y JY se lisaron 15 minutos a 4 °C con tampón de lisis (compuesto por 1 % Brij-97; 20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 3 mM MgCl₂ y una mezcla de inhibidores de proteasas) y se eliminó el material insoluble por centrifugación. Estos lisados se trataron 30 minutos a 4 °C con 0,25 mM del reactivo DTSSP (3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)) (Pierce-Thermo Scientific). La reacción se paró por incubación con 10 mM de glicina (pH 7,4) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió Tritón-X100 a una concentración final de 1 % a los lisados tratados con DTSSP y a los lisados sin tratar que se utilizaron como control. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos TS1/18 (anti- β 2), VJ1/20 o H110 (anti-CD9), que habían sido unidos previamente durante 3 horas a 4 °C a proteína-A-agarosa. Los inmunocomplejos formados se analizaron por electroforesis en geles SDS-PAGE del 7 % en condiciones reductoras (para romper los puentes disulfuro producidos por el reactivo DTSSP y separar así las proteínas) o en no reductoras (para observar los complejos formados). Finalmente, la presencia de las proteínas β 2 y CD9 se detectó mediante *western-blot* con los anticuerpos biotinilados MEM-48 o VJ1/20 respectivamente.

Ensayos de arrastre o *pull-down* con proteínas de fusión recombinantes.

Las proteínas de fusión a GST (glutación S-transferasa) que contienen la región del LEL de las tetraspaninas humanas CD9, CD81 y CD63, se prepararon como se describió anteriormente (Barreiro y col., 2005; Ho y col., 2006; Stipp y col., 2001). Las líneas celulares JY y THP-1/PMA se lisaron en tampón Tritón (1 % Tritón-X100; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas) durante 15 minutos a 4 °C y se eliminó el material insoluble por centrifugación. Los lisados obtenidos se incubaron con 20 μ g/ml de las proteínas fusionadas a GST durante toda la noche a 4 °C. Los complejos formados se unieron a GSH-agarosa (Sigma) durante 3 horas a 4 °C y se lavaron 3 veces con tampón Tritón diluido 1/5. Las muestras obtenidas se fraccionaron en geles de acrilamida en condiciones no reductoras y se detectó la presencia de la subunidad β 2 de las integrinas mediante *western-blot* con el

anticuerpo MEM-48 como se ha descrito anteriormente. Como control de la cantidad de proteínas de fusión que se añade en cada experimento se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).

Para los ensayos de *pull-down* con células biotiniladas se utilizó la línea celular JY. Estas células se lavaron 3 veces con PBS frío y se marcaron las proteínas de la superficie celular con 1 mM de biotina (EZ-LinkR Sulfo-NHS-LC-Biotin - Thermo Scientific) preparada en PBS con 1 mM de CaCl_2 y 1 mM de MgCl_2 . Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, se lavaron las células dos veces en PBS frío con 100 mM de glicina para detener el marcaje y eliminar el exceso de biotina. Las células marcadas se lisaron con tampón Tritón 1% y se siguió el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente para los ensayos de *pull-down* con células sin marcar.

Ensayos de adhesión celular.

Para realizar los ensayos de adhesión celular se recubrieron, mediante incubación a 4 °C durante toda la noche, pocillos de placas p96 de fondo plano con 6 µg/ml (para los experimentos con células THP-1/PMA y linfoblastos humanos) o 12 µg/ml (para las líneas celulares JY, HSB-2 y Jurkat) de ICAM-1-Fc o con 10 µg/ml de Fibronectina diluidos en PBS. Para evitar uniones inespecíficas, al día siguiente se incubaron los pocillos con BSA al 1 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las distintas líneas celulares usadas se marcaron 20 minutos a 37 °C con la sonda fluorescente verde BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína-acetoximetil éster) (Sigma). Las células marcadas se diluyeron en tampón de adhesión (HEPES 20 mM pH 7,4; NaCl 149 mM y 2 mg/ml glucosa conteniendo 0,4 mM Mn^{2+} o 1 mM Mg^{2+} /0,5 mM Ca^{2+}) y se repartieron 2×10^5 células por cada pocillo de la p96. A continuación se añadieron 20 µg/ml de los AcMs anti-CD9 (VJ1/20, PAINS-10 y PAINS-13), anti-β2 (Lia3/2 y KIM185), anti-β1 (Lia1/2 y TS2/16) o el anticuerpo control anti-HSPA8 (PAINS-18), se incubaron con las células 15 minutos a 4 °C y, posteriormente, se permitió la adhesión de las células durante 20-60 minutos (dependiendo del tipo celular) a 37 °C. Antes de lavar las células no adheridas, se cuantificó la fluorescencia en un lector de placas (TecanGENios) y, este valor de la fluorescencia total, se utilizó como 100 % de adhesión. El lavado se realizó sumergiendo la placa 20 minutos en PBS a 37 °C de forma que la placa quede boca abajo y las células no adheridas se separaron por gravedad. Después del lavado se volvió a medir la fluorescencia de las células que quedaron adheridas.

En los experimentos en los que se analizó el efecto del manganeso en la adhesión de LFA-1 a ICAM-1-Fc, el tampón de adhesión contenía 1 mM Mg^{2+} /0,5 mM Ca^{2+} para reflejar la situación control o 20, 40 o 400 µM de Mg^{2+} . Para los experimentos en los que se estimuló la

adhesión con PMA, las células HSB-2 o Jurkat (con o sin CD9) se trataron con 50 o 200 ng/ml de PMA en RPMI-1640 durante 2 horas a 37 °C antes de la tinción con la sonda fluorescente. Después se siguió el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

También se realizaron experimentos de adhesión en flujo, en los que las células JK TR2 y JK shCD9 se activaron con 100 ng/ml de PMA durante 1 hora y se marcaron con las sondas fluorescentes CFSE (Molecular Probes), las células JK TR2, o CMAC (Invitrogen), las células JK shCD9. Una vez marcadas, las células se adhirieron sobre 5 µg/ml de ICAM-1-Fc durante 15 minutos a 37 °C. El flujo de medio comenzó en 0,5 dyn/cm² y se incrementó, a intervalos de un minuto, hasta 20 din/cm². El número de células adheridas se calculó normalizando respecto al número de células inicial observado con el flujo mínimo (0,5 dyn/cm²).

Ensayo de capacidad citotóxica.

Para los ensayos de capacidad citotóxica, los linfocitos T se trataron con IL-2, generando una población de células con elevada capacidad citotóxica denominadas células citotóxicas activadas por linfoquinas (LAK - *Lymphokine-Activated Killer cell*). Estos experimentos se realizaron como se ha descrito anteriormente en el trabajo de Dransfield y col. (Dransfield y col., 1992a; Robertson y col., 1990) con algunas modificaciones. Se utilizaron las células Daudi como células Diana y linfoblastos T (tratados durante 7-10 días con 50 U/ml de IL-2) como células efectoras. Ambos tipos celulares (4×10^4 células Daudi y 4×10^5 linfoblastos T) se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en U en un volumen final de 200 µl. Para estudiar el efecto de los AcMs VJ1/20, PAINS-10, PAINS-13, TS1/18 y HSPA8, éstos se añadieron a las células a una concentración de 50 µg/ml. Las células se incubaron junto con los anticuerpos durante 5 horas a 37 °C y se determinó el porcentaje de citotoxicidad celular mediante la cantidad de actividad LDH (lactato deshidrogenasa), medida como la reducción de INT (cloruro de 2-(p-Iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio) hasta un producto de formazán rojo en el sobrenadante de los cultivos celulares. Con este objetivo, se mezclaron 100 µl del sobrenadante de las células, 20 µl solución de lactato (Sigma, 36 mg/ml en 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5), 20 µl de solución de INT (Sigma, 2 mg/ml en PBS) y 20 µl de una solución que contiene NAD⁺ y diaforasa (NAD⁺: Sigma, 3 mg/ml; diaforasa: Boehringer, 13,5 U/ml; 0,03 % BSA y 1,2 % de sacarosa en PBS). Esta mezcla, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y la reacción se paró con 20 µl de oxamato (Sigma, 16,6 mg/ml en PBS). La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placas (TecanGENios).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS (IBM) mediante el análisis de varianza (ANOVA). Para las comparaciones múltiples se realizaron pruebas post-hoc y, en el caso que se cumpliera la homocedasticidad, se utilizó el test de Bonferroni para el análisis de los datos. Se consideraron significativas las diferencias cuando el nivel de significación fue igual o menor a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

La tetraspanina CD9 interacciona con la integrina LFA-1 en la superficie celular de diferentes tipos de leucocitos.

Como primer paso para estudiar si existe una interacción entre la tetraspanina CD9 y la integrina leucocitaria LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta 2$) se analizó la existencia o no de colocalización en la superficie celular de la línea monocítica THP-1. Se seleccionó esta línea celular porque expresa en su membrana plasmática CD9 y las tres integrinas $\beta 2$ mayoritarias ($\alpha\text{L}\beta 2$, $\alpha\text{M}\beta 2$ y $\alpha\text{X}\beta 2$) (**Figura 9A**, panel superior). Cuando se trata a estas células con el éster de forbol PMA durante 24 horas se induce su diferenciación hacia células de tipo macrófago y se produce un aumento de la expresión tanto de CD9 (Gutiérrez-López y col., 2011) como de las integrinas $\beta 2$ ($\alpha\text{L}\beta 2$, $\alpha\text{M}\beta 2$ y $\alpha\text{X}\beta 2$) (Carman y Springer, 2003) (**Figura 9A**, panel inferior). Para los ensayos de colocalización se realizaron dobles tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para la subunidad $\beta 2$ de las integrinas (AcM TS1/18) y para CD9 (anticuerpo policlonal de conejo H110) en células THP-1 sin permeabilizar (marcaje de la superficie celular). Como se puede observar en los paneles superiores de la **figura 9B**, la tetraspanina CD9 y la subunidad $\beta 2$ de las integrinas colocalizan parcialmente en la superficie de la línea celular THP-1.

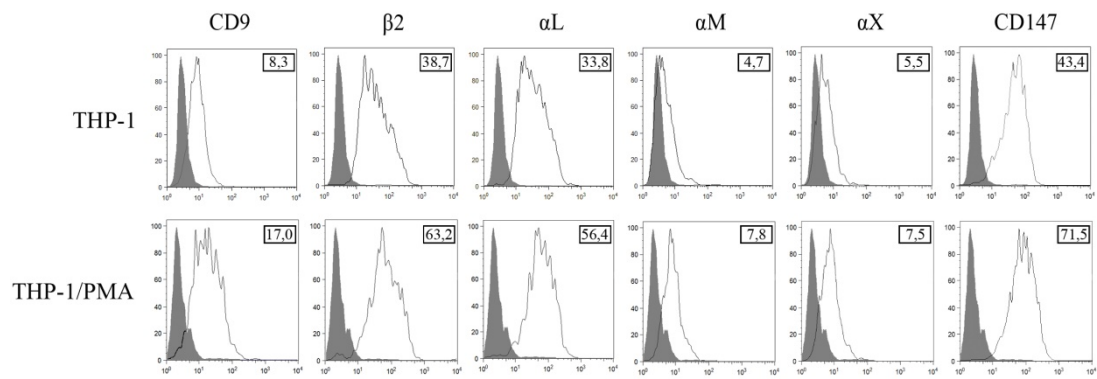
La activación de las integrinas $\beta 2$ puede ser inducida experimentalmente mediante la adición del catión divalente Mn^{2+} al medio de cultivo celular. Este catión induce la adquisición de una conformación de mayor afinidad en las integrinas y provoca que cambie su distribución por la superficie celular de encontrarse repartidas uniformemente a estar agrupadas formando “parches” (Rodríguez-Fernández y col., 2001). Realizando la inmunofluorescencia después de tratar las células con 0,4 mM de Mn^{2+} durante 20 minutos, se observa que CD9 colocaliza preferentemente con los agrupamientos de $\beta 2$ que aparecen al activar las integrinas con este catión (**Figura 9B**, paneles centrales).

En la membrana plasmática de la línea celular THP-1 tratadas 24 horas con 100 ng/ml de PMA, la colocalización entre CD9 y $\beta 2$ aumenta respecto a las células sin diferenciar (**Figura 9B**, comparar los coeficientes de Pearson en los gráficos de la derecha) y es más evidente en las zonas de contacto célula-célula de los agregados celulares producidos durante el proceso de diferenciación hacia macrófagos.

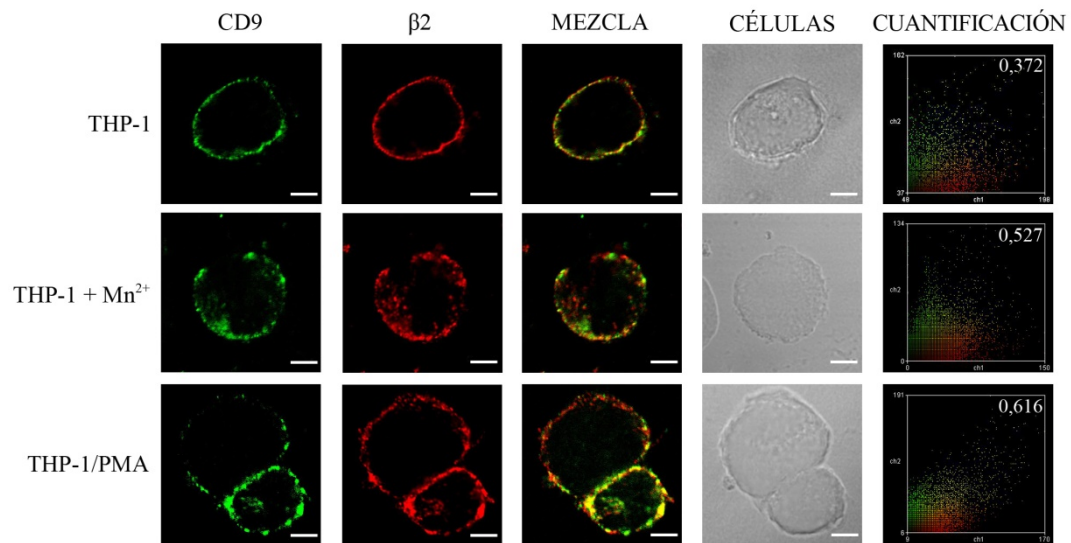
Puesto que el anticuerpo usado en estos experimentos (TS1/18) no distingue entre las diferentes integrinas con subunidades $\beta 2$, se realizó el mismo experimento con CD9 (H110) y un anticuerpo frente a la subunidad αL (AcM TS1/11), que es específica de LFA-1 (**Figura 9C**). El patrón de colocalización entre estas dos proteínas es muy similar al observado entre $\beta 2$ y CD9, es decir, la señal de colocalización aumenta al activar las integrinas con Mn^{2+} y al diferenciar las células con PMA.

RESULTADOS

A



B



C

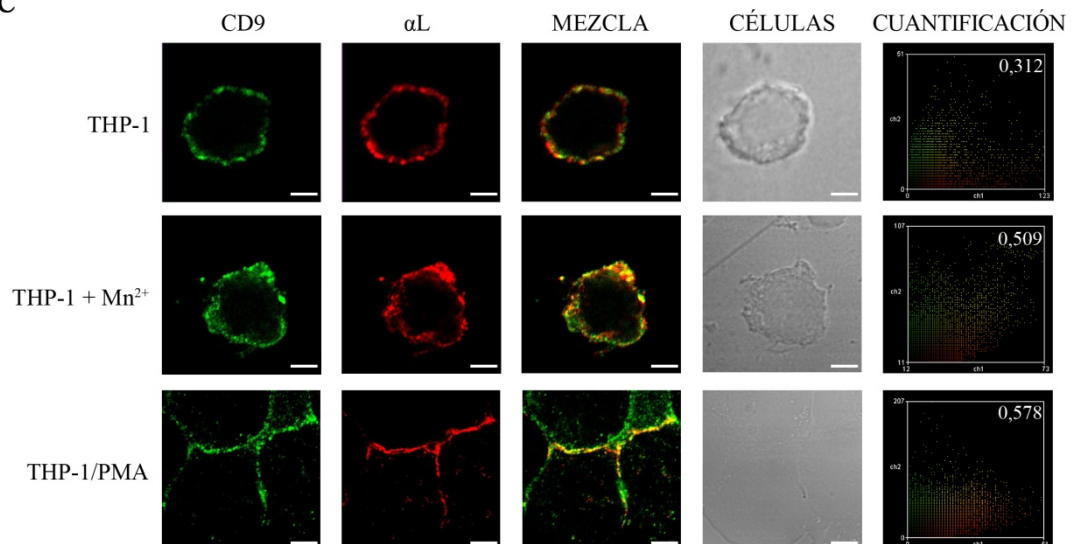


Figura 9: CD9 y LFA-1 colocalizan en la superficie de las células THP-1. **A)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de las proteínas CD9, $\beta 2$, αL , αM , αX y CD147 en la superficie celular de línea monocítica THP-1 o en las THP-1 diferenciadas hacia macrófagos con PMA (THP-1/PMA). El histograma gris representa la expresión del control negativo y el histograma blanco la expresión de la molécula indicada en la parte superior del gráfico. Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia. **B)** y **C)** Microscopía confocal de células THP-1, THP-1 tratadas con 0,4 mM de Mn^{2+} o células THP-1 diferenciadas 24 horas con 100ng/ml de PMA. Estas células se tiñeron con anticuerpos específicos para CD9 (verde) y $\beta 2$ (rojo, panel **B**) o αL (rojo, panel **C**). Se muestran imágenes representativas de secciones celulares de cada canal de confocal junto con la imagen de superposición de los canales (mezcla), la imagen de la células en campo claro y la cuantificación de la colocalización (coeficiente de Pearson). Barra calibradora = 5 μm .

RESULTADOS

Para comprobar la especificidad de las interacciones de CD9 con $\beta 2$ y αL , se realizaron dobles tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos frente a las proteínas CD9 (H110) y CD147/basigina (AcM VJ1/9), que es una metaloproteasa que se expresa de manera abundante en la superficie de algunas líneas celulares leucocitarias, como las THP-1 (ver **Figura 9A**). En este caso, no se aprecia colocalización entre CD9 y CD147 (**Figura 10**), lo que confirma la especificidad de la interacción entre la tetraspanina CD9 y las dos subunidades de la integrina LFA-1.

A

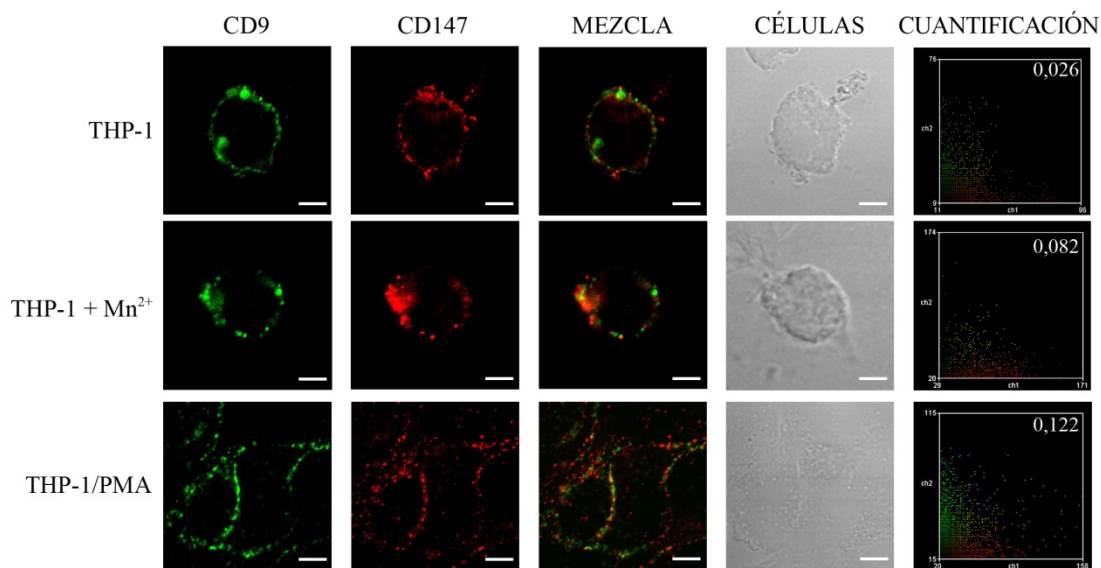


Figura 10: CD9 no colocaliza con la proteína control CD147. Microscopía confocal de células THP-1, THP-1 tratadas con 0,4 mM de Mn^{2+} y THP-1 diferenciadas con PMA. Las células se tiñeron con anticuerpos específicos frente a CD9 (H110, verde) y a la proteína CD147 (VJ1/9, rojo) para demostrar la especificidad de la colocalización entre CD9 y LFA-1 que se observa en la figura 9. Se muestran secciones representativas de microscopía confocal para cada canal (rojo o verde), la superposición de ambos canales (mezcla), el contorno celular y los histogramas de cuantificación de la colocalización que contienen el coeficiente de Pearson. Barra calibradora = 5 μm .

Después de comprobar que CD9 y LFA-1 colocalizan en la superficie de la línea celular THP-1, se decidió analizar si ocurría lo mismo en otras líneas celulares de diferentes linajes leucocitarios. Con este objetivo, se seleccionaron las líneas celulares Jurkat (linfocitos T) y JY (linfocitos B) puesto que ambas líneas celulares expresan CD9 y LFA-1. Estas líneas celulares presentan una ventaja añadida porque no expresan las otras integrinas mayoritarias de la subfamilia $\beta 2$ ($\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$), por lo tanto toda la asociación detectable de CD9 con $\beta 2$ será debida a la integrina LFA-1 (**Figura 11A**). Los resultados de colocalización son similares a los observados anteriormente con las células THP-1, existe colocalización de CD9 con $\beta 2$ (**Figura 11B**) y de CD9 con αL (**Figura 11C**) en la superficie celular de las líneas celulares JY y Jurkat y, esta colocalización, aumenta al activar a la integrina LFA-1 con el catión Mn^{2+} .

RESULTADOS

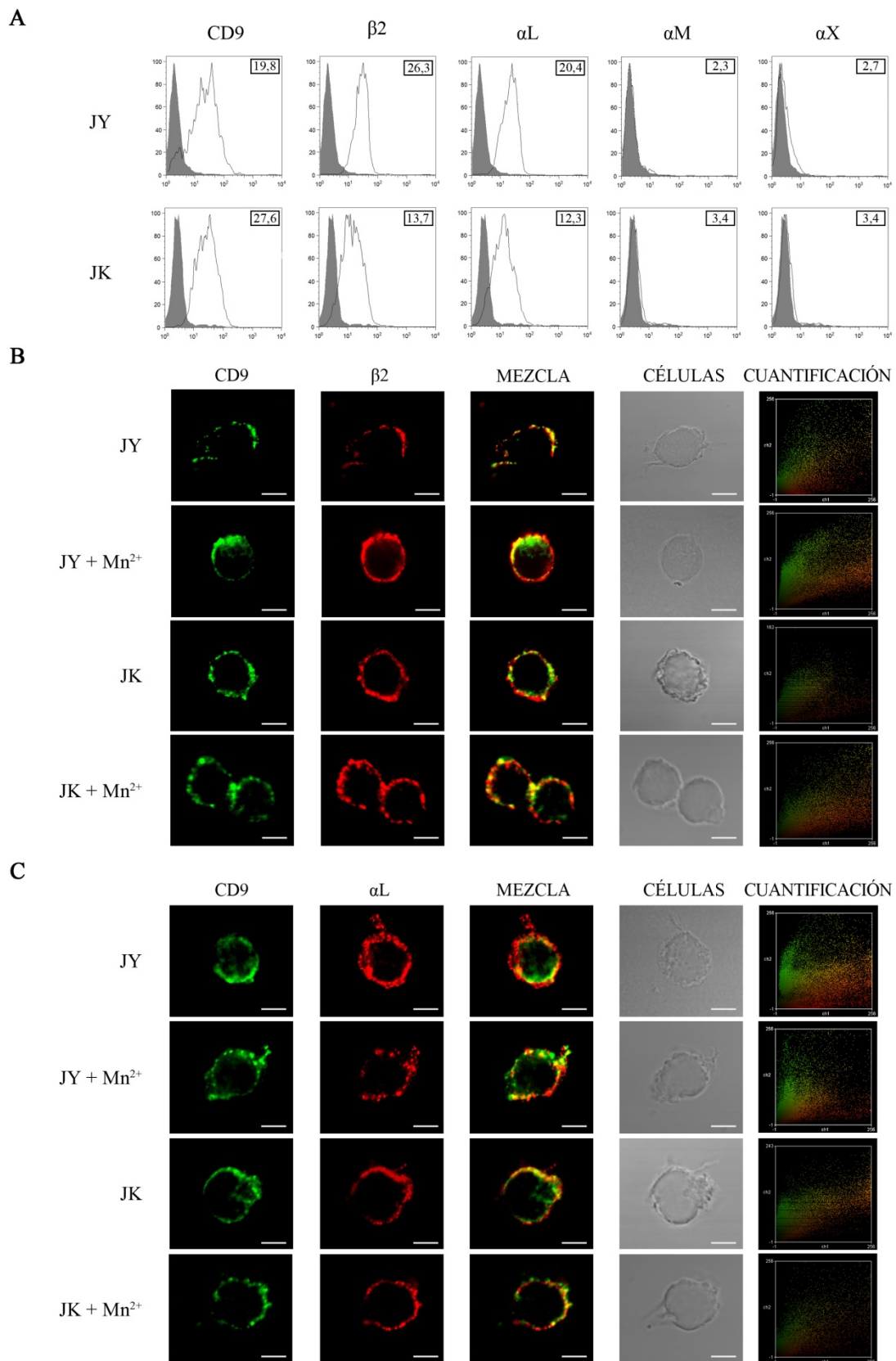


Figura 11: CD9 colocaliza con LFA-1 en la superficie de diferentes líneas leucocíticas. A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de las moléculas CD9 (VJ1/20), $\beta 2$ (TS1/18), αL (TP1/40), αM (Bear-1) y αX (HC1/1) en las líneas celulares JY (paneles superiores) y Jurkat (paneles inferiores). El histograma blanco representa la expresión de la molécula indicada en la parte superior y el gris la del control negativo. Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia. **B y C)** Microscopía confocal de células JY y Jurkat tratadas o sin tratar con 0,4 mM de Mn^{2+} . Estas células se tiñeron con anticuerpos específicos para CD9 (verde) y $\beta 2$ (rojo, panel B) o αL (rojo, panel C). Se muestran imágenes representativas de secciones celulares de cada canal de confocal, la superposición de los dos canales (mezcla), la imagen de la células en campo claro y el gráfico de cuantificación de la colocalización. Barra calibradora = 5 μm .

RESULTADOS

Para comprobar la interacción entre CD9 y LFA-1 en la membrana plasmática sugerida por los experimentos de colocalización, se llevaron a cabo experimentos de hibridación por proximidad o PLAs (*Proximity Ligation Assays*) en células THP-1 tratadas con PMA y sin permeabilizar. En estos experimentos, después de añadir a las células los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés, se añadieron anticuerpos secundarios con sondas no fluorescentes por sí mismas. La señal fluorescente del PLA sólo se produce si las dos sondas están a una distancia menor de 40 nm (distancia que las permite hibridar y amplificarse), lo que indica que estas moléculas están muy próximas entre sí, pudiendo tener una interacción directa entre ellas. Como se puede observar en la **figura 12**, la señal fluorescente aparece tanto en la superficie de las células THP-1/PMA incubadas con anticuerpos específicos frente a CD9 y $\beta 2$, como en las incubadas con anticuerpos frente a CD9 y αL , siendo la señal particularmente evidente en la zona de contacto entre las células. Como control positivo se utilizó el marcaje de CD9 y CD81, puesto que ambas moléculas interaccionan de forma directa en la membrana plasmática formando heterodímeros (Kovalenko y col., 2004; Le Naour y col., 2006). Para comprobar la especificidad de estos ensayos se marcaron las células con anticuerpos específicos frente a CD9 y CD147/basigina, dos moléculas sobre las cuales no hay ninguna evidencia de su mutua interacción, y no se observó ninguna señal de fluorescencia en las células THP-1/PMA. En conjunto, estos resultados sugieren que CD9 se asocia con la integrina LFA-1 en la superficie de distintos tipos de células leucocitarias.

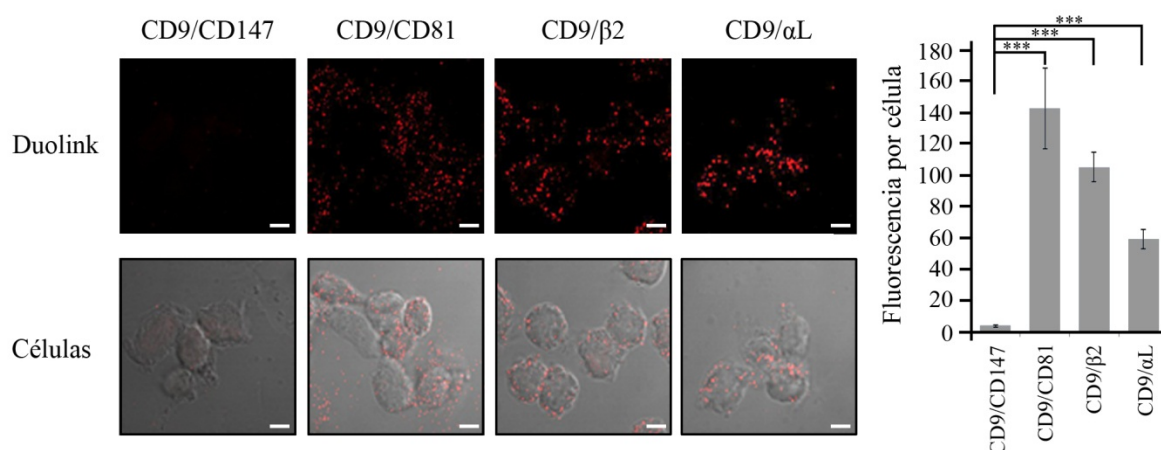


Figura 12: CD9 y LFA-1 están muy próximos en la membrana plasmática. Para los ensayos de hibridación por proximidad (PLAs) las células THP-1 tratadas con 100 ng/ml de PMA se marcaron con anticuerpos específicos para CD9 (H110) y para $\beta 2$ (TS1/18), αL (TS1/11), CD81 (5A6) o CD147 (VJ1/9). Posteriormente, se añadieron los anticuerpos secundarios que están acoplados a las sondas de oligonucleótidos como se describe en materiales y métodos. Los puntos fluorescentes rojos reflejan la existencia de una interacción entre las dos moléculas indicadas en la parte superior. Se muestra la proyección máxima en el eje z de un campo representativo de cada muestra. Barra calibradora = 5 μm . El gráfico de la derecha representa la cuantificación de la fluorescencia (media \pm ESM) en cada célula (n=20). ***p < 0,001.

RESULTADOS

Para confirmar la interacción de CD9 y LFA-1 sugerida por los ensayos de colocalización e hibridación por proximidad, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación en células THP-1/PMA y JY. En estos experimentos, se incubaron las células con los anticuerpos inmunoprecipitantes antes de lisar de forma que sólo se unen a moléculas de la superficie celular y sólo se detectarán las interacciones que se produzcan en la membrana plasmática. En primer lugar se inmunoprecipitó la subunidad $\beta 2$ de las integrinas con el AcM TS1/18, en células THP-1/PMA y JY, realizando la lisis celular en un tampón que contiene un detergente

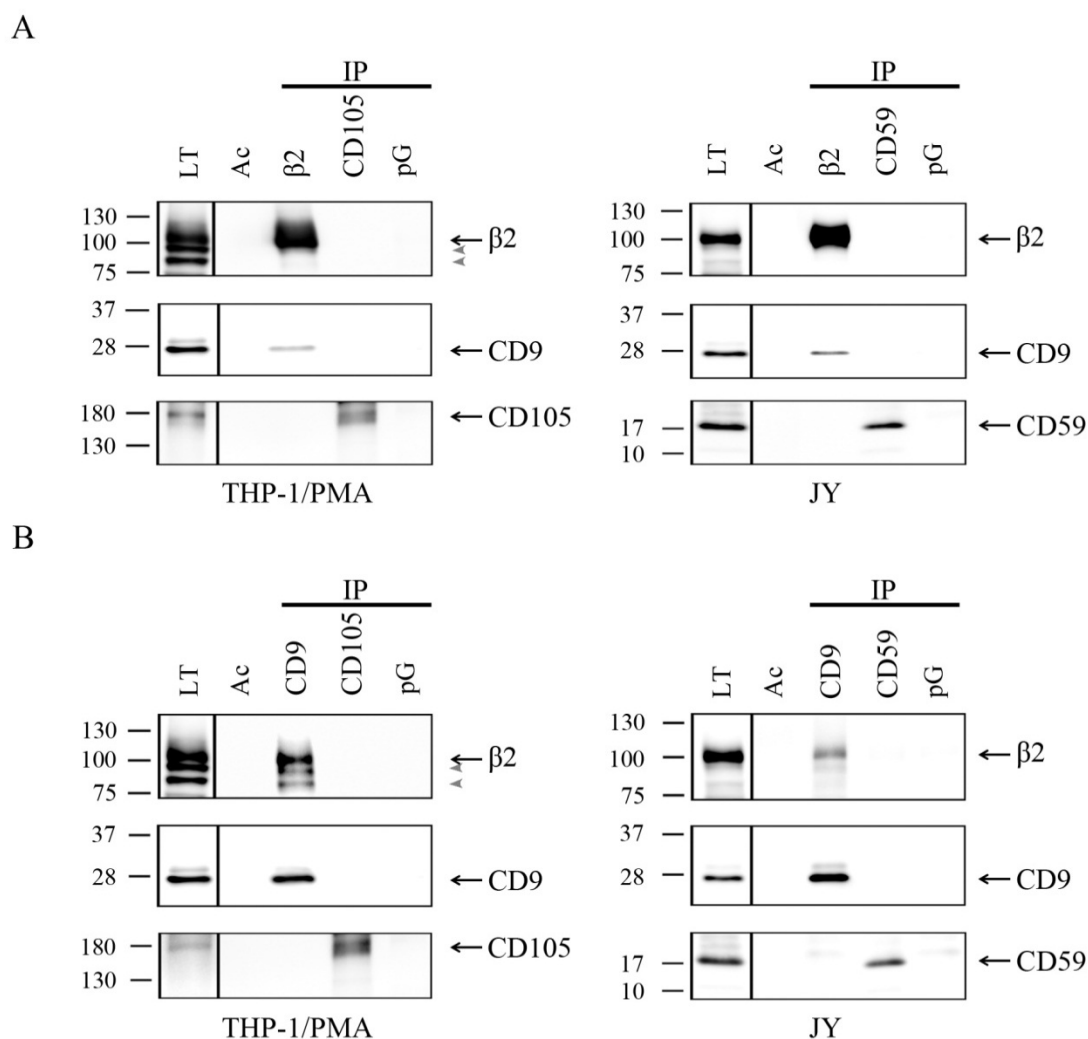


Figura 13: Co-inmunoprecipitación de CD9 y LFA-1 en células THP-1/PMA y JY. A y B) Las células THP-1/PMA (panel de la izquierda) y las JY (panel de la derecha) se incubaron con los AcMs TS1/18 (anti- $\beta 2$) (A) y VJ1/20 (anti-CD9) (B). Posteriormente se lisaron las células con detergente Brij-97, se precipitaron los inmunocomplejos con proteína G-sefarosa y se resolvieron en geles SDS-PAGE del 8 % (para detectar $\beta 2$ y CD105) y del 12% (para detectar CD9 y CD59) en condiciones no reductoras. La presencia de las moléculas de interés se analizó mediante *western-blot* con los AcMs marcados con biotina MEM-48 (para detectar $\beta 2$) y VJ1/20 (para detectar CD9) y los AcMs control P4A4 (que reconoce CD105) y VJ1/12 (que reconoce CD59). La figura es representativa de 3 experimentos independientes. Las bandas secundarias de $\beta 2$ (marcadas con puntas de flecha grises) probablemente son diferentes formas de glicosilación o formas parcialmente degradadas de la proteína. Los pesos moleculares (en kilodaltons) están indicados a la izquierda de cada panel. LT: lisado total. Ac: anticuerpo. pG: proteína G-sefarosa sin ningún anticuerpo unido.

RESULTADOS

de fuerza media (Brij-97). Como se puede apreciar en la **figura 13A**, al revelar con un anticuerpo frente a CD9 (VJ1/20) se observa claramente una banda de aproximadamente 24 kDa en la inmunoprecipitación de $\beta 2$ que no aparece en la inmunoprecipitación de las proteínas control (CD105/endoglina en el caso de las células THP-1/PMA y CD59 en las JY), lo que indica que CD9 co-inmunoprecipita con LFA-1 (puesto que, como se ha mencionado anteriormente, las células JY no expresan ninguna otra integrina $\beta 2$). Esta co-inmunoprecipitación también se produce en el orden inverso, es decir, se observa co-inmunoprecipitación de $\beta 2$ cuando se inmunoprecipita con un anticuerpo frente a CD9 como el VJ1/20 (**Figura 13B**). Como en el caso anterior, no se observa ninguna banda en la inmunoprecipitación de las proteínas control.

Estas co-inmunoprecipitaciones demuestran que CD9 y LFA-1 interactúan, pero no resuelven si esta interacción es directa ya que el detergente utilizado para lisar las células, Brij-97, tiene una fuerza media y no sólo mantiene las interacciones directas sino que también preserva las interacciones de segundo orden (ver **Figura 5**). Por lo tanto, el siguiente paso fue realizar estas inmunoprecipitaciones lisando las células con un tampón que contiene Tritón-X100 al 1 %, un detergente más fuerte con el que sólo se mantienen las interacciones directas. Del mismo modo que en los experimentos anteriores, se realizaron inmunoprecipitaciones incubando las células THP-1/PMA y JY con los anticuerpos inmunoprecipitantes antes de lisarlas para detectar únicamente interacciones de la membrana plasmática (**Figura 14**). En estas condiciones, también se observa co-inmunoprecipitación de CD9 cuando se inmunoprecipita $\beta 2$ y, ocurre lo mismo en el orden inverso, inmunoprecipitando CD9 se arrastra $\beta 2$ lo que apunta a que la interacción de estas moléculas en la superficie celular podría ser directa.

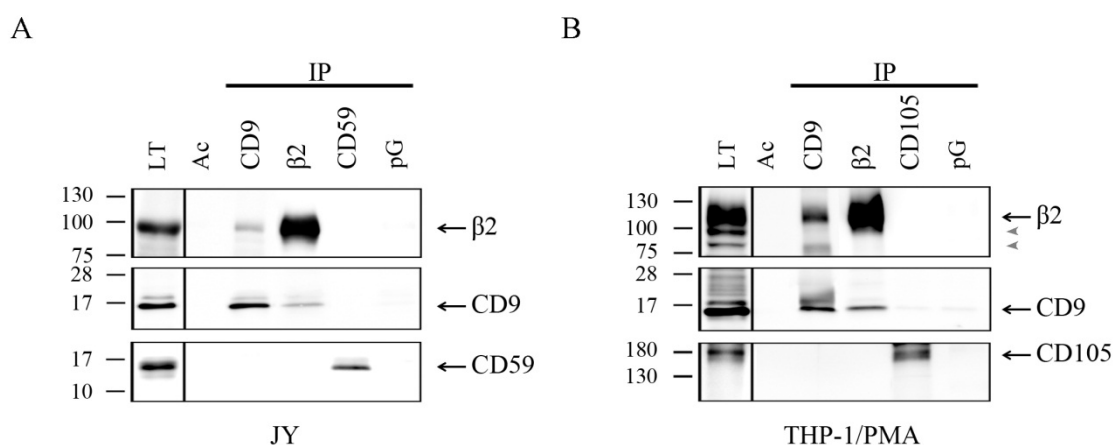


Figura 14: CD9 y $\beta 2$ interactúan de forma directa en la superficie celular. Las líneas celulares THP-1/PMA y JY se lisaron, con un tampón de lisis que lleva como detergente Tritón-X100 al 1 %, después de la incubación con los AcMs inmunoprecipitantes dirigidos frente a $\beta 2$ (TS1/18), CD9 (VJ1/20), CD59 (VJ1/12) o CD105 (P4A4). La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante *western-blot* con anticuerpos específicos para cada proteína. Los pesos moleculares (en kilodaltons) se indican a la izquierda de cada panel. Las puntas de flecha grises representan bandas secundarias de la subunidad $\beta 2$ de las integrinas. LT: lisado total. Ac: anticuerpo. pG: proteína G-sefara sin ningún anticuerpo unido.

RESULTADOS

Para descartar que la interacción observada entre CD9 y $\beta 2$ en las inmunoprecipitaciones anteriores fuese una unión inespecífica causada por la incubación de los anticuerpos con células intactas (no con lisados) a 37 °C, se realizaron inmunoprecipitaciones incubando las células con los anticuerpos a 4 °C, de forma que se evita cualquier posible activación celular desencadenada por acción de estos anticuerpos (**Figura 15**). Realizando las inmunoprecipitaciones de este modo se observan prácticamente los mismos resultados que en los experimentos realizados a 37 °C, por lo que se descarta que la co-inmunoprecipitación sea causada por una activación celular desencadenada por los anticuerpos.

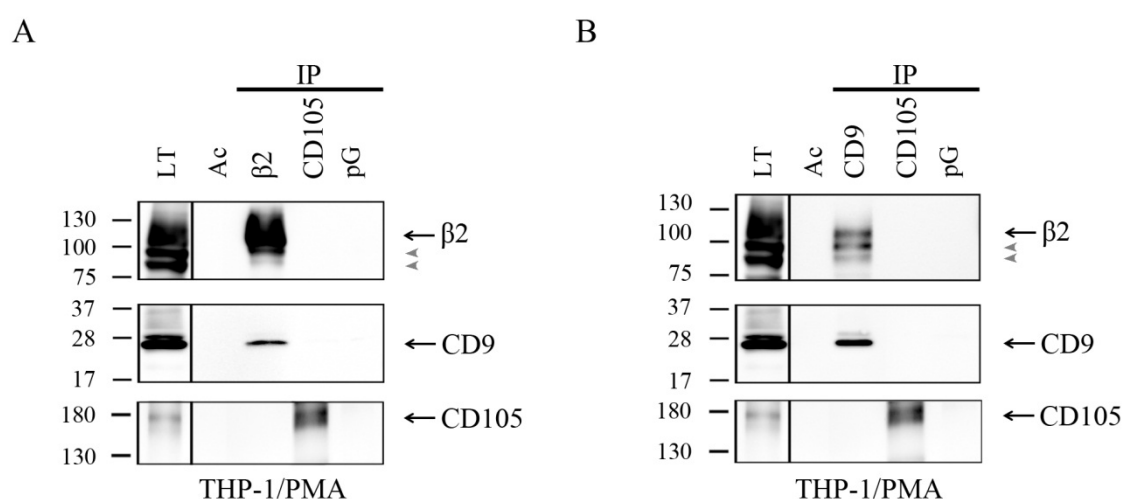


Figura 15: Co-inmunoprecipitación de CD9 y $\beta 2$ incubando los anticuerpos en frío. Las células THP-1/PMA se incubaron a 4° C con los AcMs inmunoprecipitantes TS1/18 (anti- $\beta 2$, panel A), VJ1/20 (anti-CD9, panel B) o con el AcM control P4A4 (CD105). Después se lisaron en tampón de lisis con 1 % Tritón-X100 y se precipitaron los inmunocomplejos con proteína G-sefarosa. La presencia de las proteínas indicadas se detectó mediante *western-blot* en condiciones no reductoras con los AcMs MEM-48 (anti- $\beta 2$) (paneles superiores) y VJ1/20 (anti-CD9) (paneles intermedios) biotinilados o con el AcM P4A4 (anti-CD105) (paneles inferiores). Las puntas de flecha grises representan bandas secundarias de la subunidad $\beta 2$ de las integrinas. LT: lisado total. Ac: anticuerpo. pG: proteína G-sefarosa sin ningún anticuerpo unido.

El siguiente paso que se dio para profundizar en la naturaleza de la interacción entre CD9 y $\beta 2$ fue la realización de experimentos de entrecruzamiento químico (*crosslinking*). En estos experimentos se trata a las células con un reactivo de entrecruzamiento (formado por dos grupos reactivos en los extremos separados por un brazo espaciador) que une de forma covalente dos moléculas que estén a una distancia determinada que depende de la longitud del brazo espaciador. En estos experimentos se utilizó el reactivo DTSSP, que une de forma covalente a dos proteínas que están muy próximas entre sí, puesto que su brazo espaciador tiene una longitud de aproximadamente 1,2 nm. Además, este reactivo presenta un puente disulfuro que se puede romper usando condiciones reductoras, de forma que las proteínas inicialmente entrecruzadas covalentemente se pueden separar y migrarán en geles SDS-PAGE según su peso molecular. Para estos experimentos las células JY y THP-1/PMA se lisaron en un tampón con 1

RESULTADOS

% de Brij-97, se trataron con el agente de entrecruzamiento DTSSP y posteriormente se les añadió o no el detergente Tritón-X100 a una concentración final del 1 %. A partir de estos lisados tratados con DTSSP, se inmunoprecipitó $\beta 2$ con el AcM TS1/18 y las moléculas precipitadas se resolvieron en un gel de acrilamida del 12 % en condiciones reductoras para romper el enlace covalente y detectar si CD9 se ha entrecruzado con $\beta 2$. En la **figura 16** se puede observar un aumento de la cantidad de CD9 co-inmunoprecipitado cuando se realiza el entrecruzamiento químico, tanto en las células JY (**Figura 16A**) como en las THP-1/PMA (**Figura 16B**).

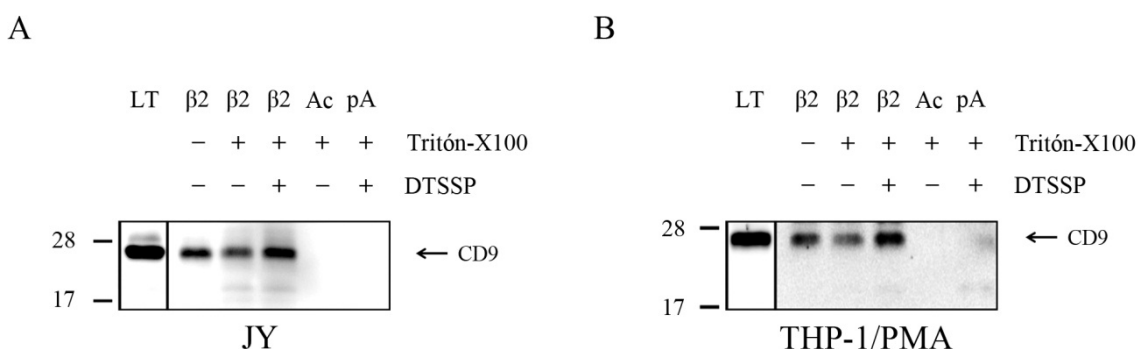


Figura 16: Ensayos de entrecruzamiento químico. Las células JY (A) y THP-1/PMA (B) se lisaron en un tampón de lisis con 1 % Brij-97 y se trataron con el reactivo DTSSP. Posteriormente, se añadió Tritón-X100 a una concentración final del 1 % a estos lisados y a los lisados sin tratar que se utilizaron como control. Las muestras se inmunoprecipitaron con un AcM anti- $\beta 2$ (TS1/18), se resolvieron en geles de SDS-PAGE del 12 % en condiciones reductoras y se revelaron con el AcM VJ1/20 (anti-CD9) biotilado. LT: lisado total. pA: proteína A-agarosa sin ningún anticuerpo unido.

Además de estos ensayos, se realizaron experimentos de entrecruzamiento químico en los que se inmunoprecipitó tanto CD9 (VJ1/20) como $\beta 2$ (TS1/18) en células JY, pero se prepararon las muestras en condiciones no reductoras, de forma que los complejos formados por la acción del DTSSP no se separaron (**Figura 17A**). En este caso se observan complejos de alrededor de 300 kDa, en las células tratadas con DTSSP, tanto en el carril de la inmunoprecipitación de $\beta 2$ (carril 2) como en el de CD9 (carril 4), que podrían corresponder a complejos covalentes formados por CD9 y LFA-1 ($\alpha L = 185$ kDa; $\beta 2 = 95$ kDa; CD9 = 24 kDa). Para demostrar que estos complejos están formados por CD9 y LFA-1, es decir, que los complejos detectados anteriormente en las dos inmunoprecipitaciones son los mismos, se realizaron ensayos de entrecruzamiento químico inmunoprecipitando con un AcM anti- $\beta 2$ (TS1/18) y con dos anticuerpos distintos anti-CD9 (VJ1/20 y H110). En este caso se revelaron todas las inmunoprecipitaciones con $\beta 2$, comprobando así que esta integrina se encuentra en los complejos aislados con los anticuerpos anti-CD9 y que éstos son los mismos complejos que los que se obtienen al inmunoprecipitar con un AcM anti- $\beta 2$ (**Figura 17B**). Todos estos ensayos de entrecruzamiento químico apoyan que la interacción entre CD9 y LFA-1 en leucocitos es de naturaleza directa.

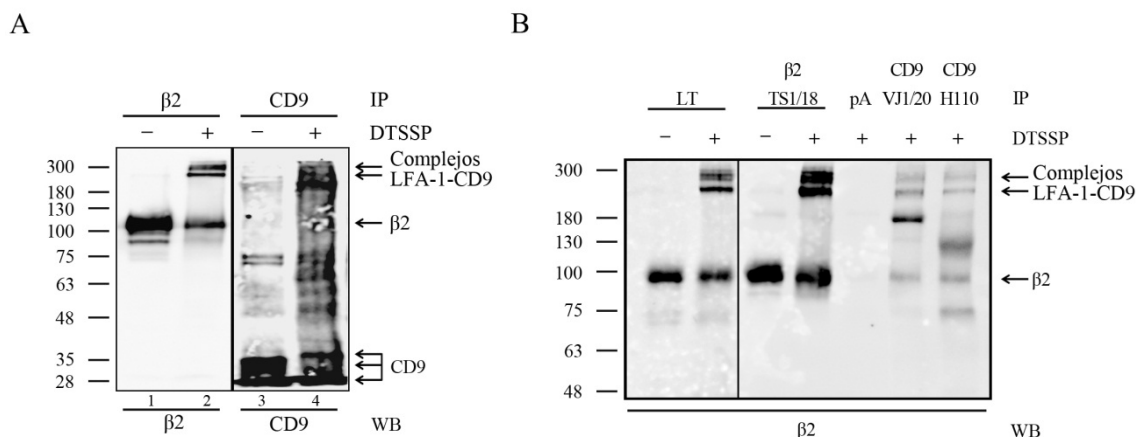


Figura 17: Análisis de los complejos LFA-1-CD9 que se forman en experimentos de entrecruzamiento químico. A) Se lisaron las células JY en Brij-97 al 1 %, se trataron (carriles 2 y 4) o no (carriles 1 y 3) con el agente de entrecruzamiento DTSSP y se les añadió Tritón-X100 a una concentración final del 1 %. Los complejos formados por entrecruzamiento, se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a β2 (TS1/18, carriles 1 y 2) o frente a CD9 (VJ1/20, carriles 3 y 4). Las muestras se resolvieron en un gel del SDS-PAGE del 7% en condiciones no reductoras y se inmunodetectaron con un AcM frente a β2 (carriles 1 y 2) o frente a CD9 (carriles 3 y 4). **B)** Las células JY se lisaron con tampón de lisis con 1 % de Brij-97 y se trataron (+) o no (-) con DTSSP según se indica. Después se añadió Tritón-X100 a una concentración final 1 % y se inmunoprecipitaron las muestras con los AcMs TS1/18 (anti-β2) o VJ1/20 (anti-CD9) o con el anticuerpo policlonal de conejo H110 (anti-CD9). Las muestras se corrieron en un gel del SDS-PAGE del 7% en condiciones no reductoras. Todas las muestras se revelaron con el anticuerpo anti-β2 biotinilado MEM-48. LT: lisado total. pA: proteína A-agarosa sin ningún anticuerpo unido.

La interacción entre CD9 y LFA-1 se realiza a través del dominio LEL de CD9.

La mayoría de las interacciones de tipo lateral que se han descrito de las tetraspaninas con otras proteínas de la superficie celular, y concretamente con integrinas, ocurren a través de la región variable del dominio extracelular grande o LEL (Levy y Shoham, 2005b; Stipp y col., 2003). Para saber si la interacción de CD9 con LFA-1 se produce a través de este dominio de CD9 se realizaron ensayos de arrastre molecular o *pull-downs* usando una proteína de fusión formada por el dominio LEL de CD9 unido a la proteína GST (CD9-LEL-GST) (Gilsanz y col., 2013; Ho y col., 2006). Como se puede observar en la **figura 18A**, la subunidad β2 de la integrina LFA-1 es arrastrada por la construcción CD9-LEL-GST en lisados de células JY (panel de la izquierda) y de THP-1/PMA (panel de la derecha). Como control positivo se utilizó otra construcción similar que contiene el dominio LEL de CD81 unido a GST (CD81-LEL-GST) que, como ya se había descrito previamente (Takeda y col., 2003), se une y arrastra a β2. Como controles negativos se utilizaron una construcción de GST con el LEL de la tetraspanina CD63 (CD63-LEL-GST) y la proteína GST sola. Ninguna de estas construcciones usadas como control negativo arrastran a β2, lo que refleja la especificidad de la interacción entre CD9 y LFA-1. También se realizaron ensayos de arrastre de proteínas con células JY biotiniladas de forma que, revelando con el anticuerpo secundario estreptavidina-HRP, podemos detectar qué

RESULTADOS

proteínas son arrastradas por la construcción LEL-CD9-GST (**Figura 18B**). Para saber qué bandas corresponden a la integrina LFA-1 simultáneamente a estos ensayos de arrastre se realizaron inmunoprecipitaciones con TS1/18 (anti- $\beta 2$) tanto en las células biotiniladas (último carril del panel de la izquierda) como en células sin biotinar (panel de la derecha). En la **figura 18B** se observa cómo la construcción CD9-LEL-GST arrastra tanto a la subunidad $\beta 2$ como a la subunidad αL de LFA-1 y esto no sucede en los controles negativos (CD63-LEL-GST y GST). Todos los resultados bioquímicos mostrados apoyan la existencia de una interacción directa

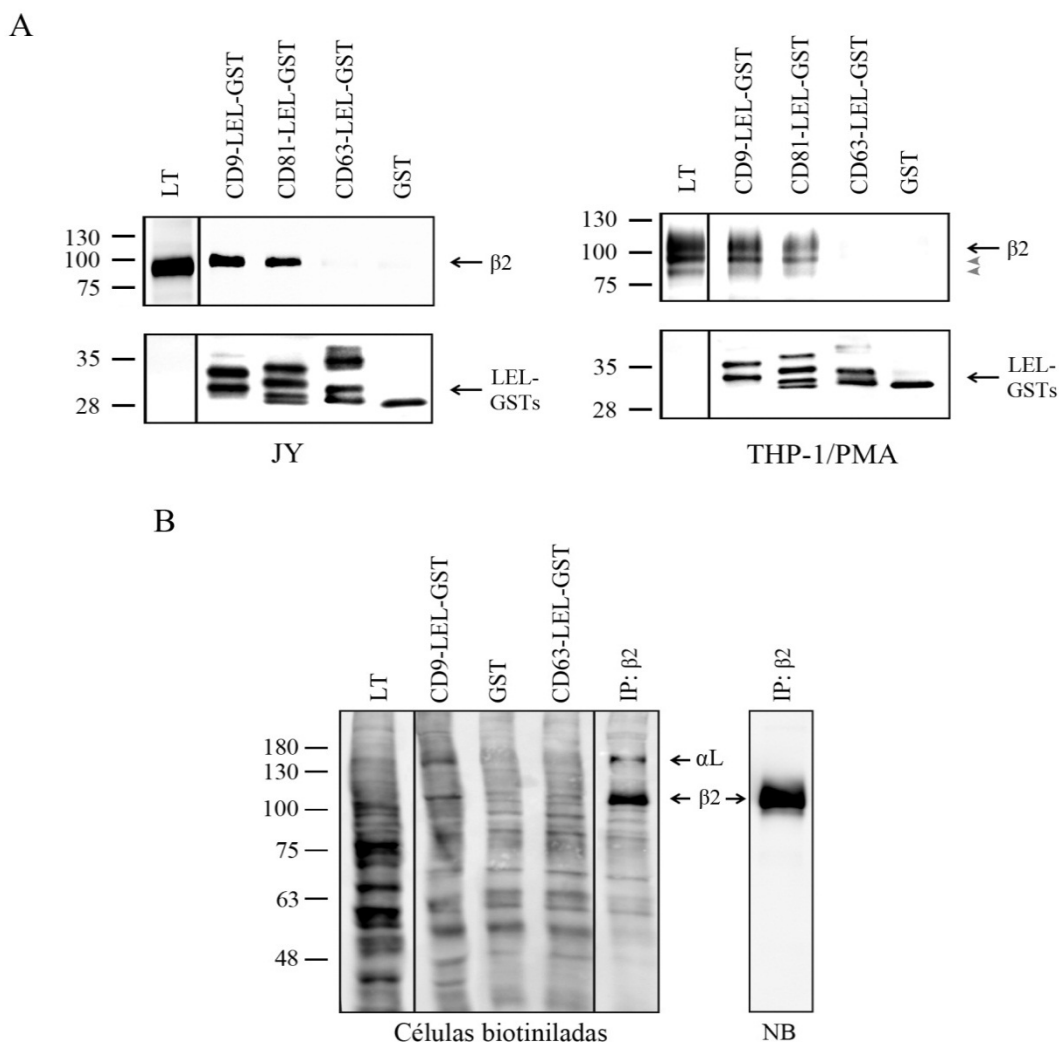


Figura 18: La interacción entre CD9 y LFA-1 se produce a través del dominio LEL de CD9. A) Las células JY (panel de la izquierda) y THP-1/PMA (panel de la derecha) se lisaron en tampón con 1 % Tritón-X100 y se incubaron con las construcciones quiméricas de los LEL de CD81 (CD81-LEL-GST) y CD9 (CD9-LEL-GST) fusionadas a GST. Las construcciones CD63-LEL-GST y GST se utilizaron como controles negativos de posibles uniones inespecíficas. Los complejos formados se unieron a bolas de glutatión-agarosa y se analizó la presencia o no de $\beta 2$ en estos complejos mediante *western-blot* con el AcM MEM-48. Como control de carga de las proteínas unidas a GST se utilizó un anticuerpo policlonal frente a GST. **B)** Las células JY se marcaron en superficie con biotina y, a continuación, se lisaron e incubaron con las proteínas quiméricas como se ha descrito en el apartado A. Como control, se inmunoprecipitó $\beta 2$ (IP: $\beta 2$) tanto en células biotiniladas (último carril del panel de la izquierda) como en células no biotiniladas (panel de la derecha). Los complejos formados en células biotiniladas se detectaron con estreptavidina-HRP y la inmunoprecipitación con células no biotiniladas se reveló con el AcM MEM-48. LT: lisado total. NB: células no biotiniladas.

entre la tetraspanina CD9 y la integrina LFA-1 que se produce a través del dominio LEL de la tetraspanina.

Anticuerpos anti-CD9 inhiben la adhesión mediada por la integrina LFA-1.

Después de comprobar que existe una interacción de CD9 con LFA-1 en la superficie de los leucocitos, se estudió si CD9 era capaz de regular funcionalmente a LFA-1. El primer paso fue comprobar el efecto que tenían distintos anticuerpos que reconocen CD9 (VJ1/20, PAINS-10 y PAINS-13) en la adhesión de LFA-1 a su ligando ICAM-1. Se ha descrito que estos anticuerpos ejercen una acción agonista sobre CD9, es decir, el efecto de estos anticuerpos es similar al que se produce al aumentar la expresión de CD9 en distintos tipos celulares (Gilsanz y col., 2013; Gutiérrez-López y col., 2011; Ovalle y col., 2007). Para los ensayos de adhesión, las células se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM, lo que nos permite calcular el porcentaje de adhesión en función de la fluorescencia detectable en los diferentes pocillos después de eliminar, mediante lavado, las células que no se han adherido. En los ensayos de adhesión con células THP-1/PMA los AcMs anti-CD9 inhiben la adhesión de LFA-1 a ICAM-1-Fc inmovilizado en los pocillos de las placas p96 (**Figura 19A**, panel de la izquierda). Para asegurar que la adhesión que se observa es dependiente de integrinas $\beta 2$, se utilizó un

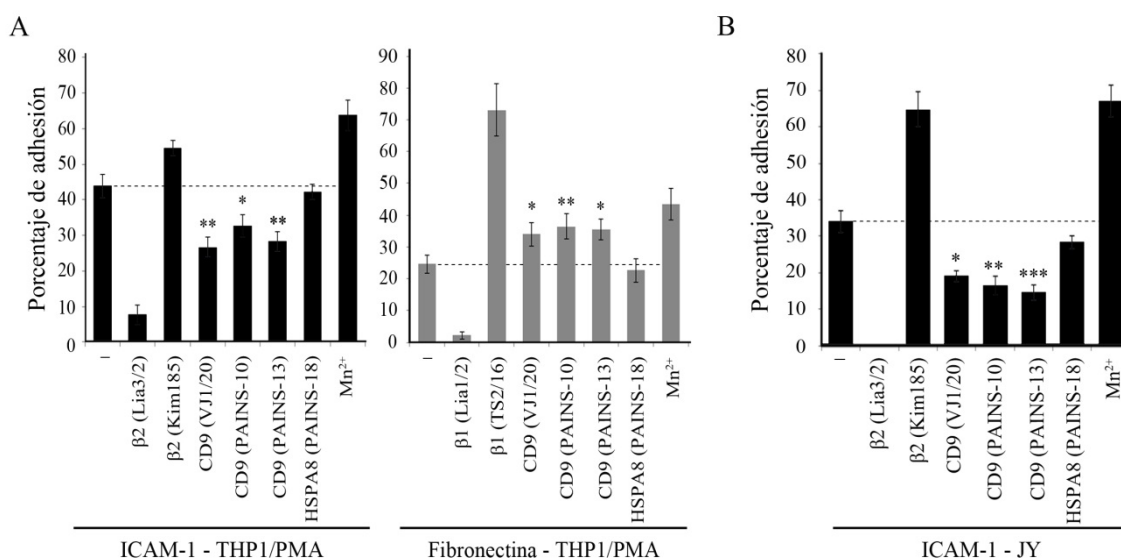
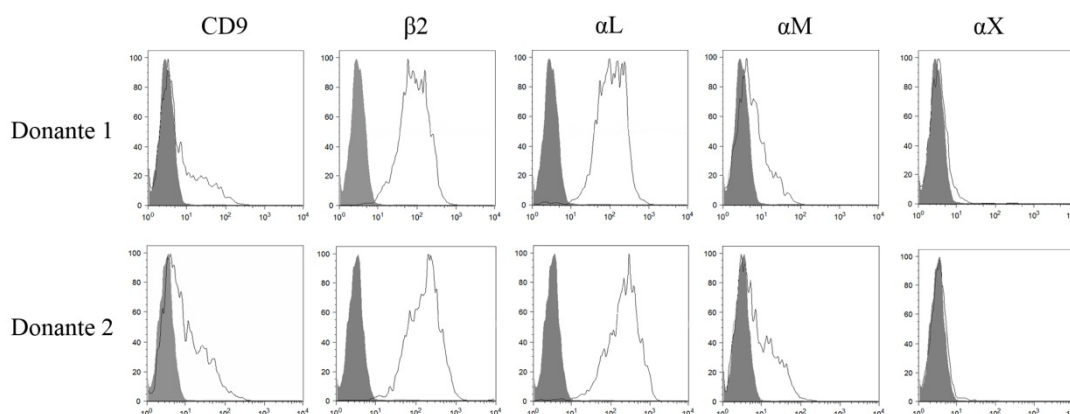


Figura 19: Anticuerpos anti-CD9 inhiben la adhesión celular dependiente de LFA-1. A) Las células THP-1/PMA se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se dejaron adherir a 37 °C durante 20 o 45 minutos a pocillos de placas p96 recubiertos con 6 $\mu\text{g/ml}$ de ICAM-1-Fc (panel de la izquierda) o a 10 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina (panel de la derecha) respectivamente en presencia de los anticuerpos indicados. Los datos representan el porcentaje medio de células que quedan adheridas después del lavado (las barras de error reflejan el ESM de 4 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados). B) Las células JY (linfocitos B) se marcaron con la sonda BCECF-AM, se sembraron en pocillos de placas p96 recubiertas con ICAM-1-Fc (12 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron durante 20 min a 37 °C con los correspondientes anticuerpos (20 $\mu\text{g/ml}$). El gráfico representa el porcentaje de adhesión (media \pm ESM) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

anticuerpo bloqueante de $\beta 2$ (Lia3/2) que bloquea prácticamente toda la adhesión de las células THP-1/PMA a ICAM-1-Fc. También se empleó un anticuerpo activador de $\beta 2$ (KIM 185) para aumentar la adhesión celular, confirmando de este modo que, en estos experimentos, la adhesión está mediada por la integrina LFA-1. Así mismo se utilizó un AcM frente a PAINS-18 (anti-HSPA8) que no afecta a la adhesión mediada por LFA-1 como control negativo y el catión Mn^{2+} (0,4 mM) como inductor de la activación de las integrinas (aumento de la adhesión). Hay que destacar que los tres anticuerpos anti-CD9 utilizados en este experimento ejercen un efecto opuesto en la adhesión al ligando de integrinas $\beta 1$ fibronectina (**Figura 19A**, panel de la derecha), potenciando la adhesión celular al mismo, lo que concuerda con resultados previos obtenidos con células de carcinoma de colon (Ovalle y col., 2007). De modo similar a lo expuesto anteriormente, la especificidad del experimento se confirmó por la inhibición casi total de la adhesión celular con un anticuerpo bloqueante de $\beta 1$ (Lia1/2) y por el aumento de la adhesión observado con el anticuerpo activador de integrinas $\beta 1$ (TS2/16). Se obtuvieron resultados muy similares en la adhesión a ICAM-1-Fc con la línea celular JY (**Figura 19B**) pero, como esta línea no expresa integrinas $\beta 1$ en su superficie, no se pudo realizar la adhesión a fibronectina.

A continuación, con objeto de estudiar un modelo más fisiológico, se realizaron experimentos similares de adhesión celular con linfocitos humanos de sangre periférica. Los linfocitos obtenidos a partir de sangre humana están en un estado de reposo y expresan muy poca cantidad de CD9 en su superficie (Berendt y col., 1992; Stewart y Hogg, 1996). Sin embargo, si se tratan estos linfocitos con IL-2 y fitohemaglutinina durante varios días se generan unas células activadas, denominadas linfoblastos, que expresan niveles detectables de CD9 en su superficie aunque varían de forma importante en función del donante. Además, estos linfoblastos tienen una alta expresión de LFA-1 ($\alpha L\beta 2$), muy poca expresión de $\alpha M\beta 2$ y no expresan $\alpha X\beta 2$ (**Figura 20A**). En los ensayos de adhesión celular estática al ligando ICAM-1-Fc realizados con estos linfoblastos se observaron efectos regulatorios similares de CD9 sobre la adhesión mediada por LFA-1 a los descritos anteriormente con líneas celulares leucocitarias. Como se puede observar en la **figura 20B** (panel izquierdo) los AcMs dirigidos frente a CD9 inhiben la adhesión mediada por esta integrina. De manera similar a lo que ocurría en línea celular THP-1/PMA, en los linfoblastos humanos estos anticuerpos tienen un efecto potenciador sobre la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ a fibronectina (**Figura 20B**, panel de la derecha). Todos los resultados anteriores indican que estos anticuerpos dirigidos frente a la tetraspanina CD9 ejercen un efecto inhibitorio en la adhesión celular mediada por la integrina LFA-1 a ICAM-1.

A



B

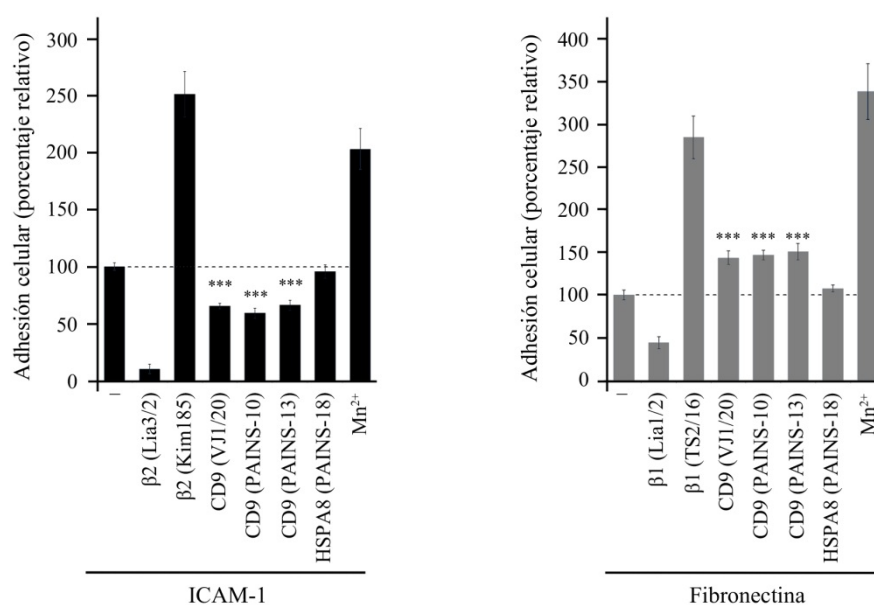


Figura 20: CD9 inhibe la adhesión mediada por LFA-1 en “linfoblastos” humanos. A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en superficie de las proteínas CD9 (VJ1/20), β2 (TS1/18), αL (TP1/40), αM (Bear-1) y αX (HC1/1) en linfoblastos obtenidos de dos donantes representativos. B) Adhesión de los linfoblastos a ICAM-1. Los linfoblastos, marcados con la sonda BCECF-AM se incubaron en placas con ICAM-1-Fc inmovilizado (6 µg/ml) durante 20 minutos a 37 °C en presencia de los anticuerpos indicados (20 µg/ml). Los datos muestran los porcentajes de células adheridas relativas a la adhesión basal: la adhesión obtenida sin tratamiento con anticuerpos se consideró 100 %. Los porcentajes son la media (± ESM) de cuatro experimentos independientes. ***p<0,001.

Los anticuerpos anti-CD9 inhiben la actividad citotóxica mediada por LFA-1.

La unión de LFA-1 a sus ligandos es esencial en muchas interacciones de los leucocitos con otras células, concretamente es muy importante en la muerte celular mediada por linfocitos citotóxicos (Anikeeva y col., 2005; Dransfield y col., 1992a; Hogg y col., 2003). Por este motivo se decidió analizar el efecto de CD9 sobre la capacidad citotóxica de los linfocitos T. Los linfocitos humanos se trataron con IL-2 para generar una población de linfocitos con

elevada capacidad citotóxica y se estudió el efecto que tienen los anticuerpos anti-CD9 sobre la muerte de las células diana (Daudi). En estos experimentos se puede observar el mismo efecto inhibitorio de CD9 sobre LFA-1 que se ha detectado anteriormente en las adhesiones, los tres anticuerpos anti-CD9 (VJ1/20, PAINS-10 y PAINS-13) reducen la muerte de las células diana (**Figura 21**). Como control de inhibición de la actividad citotóxica de las células se utilizó el anticuerpo bloqueante de $\beta 2$ TS1/18, que se ha demostrado que bloquea la adhesión dependiente de LFA-1 (Salas y col., 2004). Este resultado confirma lo observado en las adhesiones a ICAM-1-Fc, CD9 regula negativamente la adhesión mediada por LFA-1.

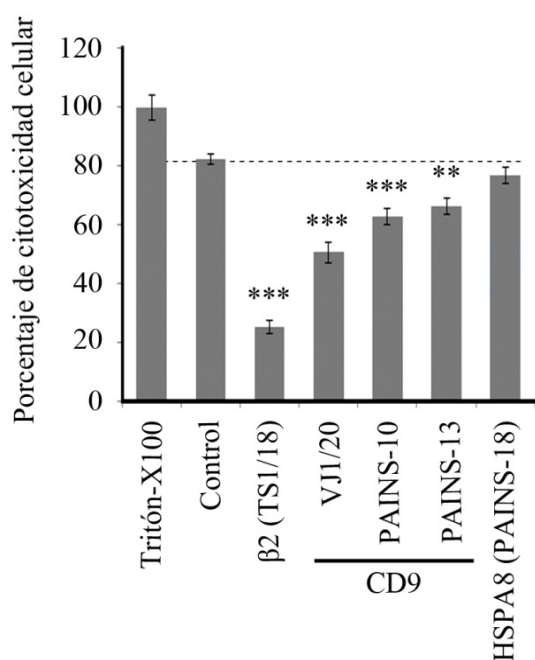


Figura 21: CD9 inhibe la actividad citotóxica de los linfocitos T. Los linfocitos T citotóxicos se trataron con los AcMs anti-HSPA8 (PAINS-18), anti-CD9 (VJ1/20, PAINS-10 y PAINS-13) o el anticuerpo bloqueante de $\beta 2$ (TS1/18). La capacidad citotóxica de estos linfocitos se analizó incubando estas células junto con las células diana Daudi con un ratio 10:1 (efectoras:diana). La citotoxicidad se midió por la cantidad de LDH liberada en el medio. Se consideró 100 % la cantidad de LDH liberada al lisar las células con Tritón-X100. Los datos muestran la media del porcentaje de citotoxicidad de 3 experimentos independientes cada uno realizado con triplicados. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

La neoexpresión o la inhibición de la tetraspanina CD9 regula la adhesión de LFA-1 a su ligando ICAM-1.

Para asegurar que el efecto observado en las adhesiones celulares mediadas por LFA-1 es debido a CD9, y no un efecto causado por los anticuerpos utilizados, el siguiente paso fue crear parejas de células que expresasen y que no expresasen CD9. Por un lado se seleccionó la línea celular de linfocitos T HSB-2, que no expresa CD9 en su superficie, y se transfectó de manera estable con un plásmido que contiene CD9 (pcDNA3-CD9). Para tener el par contrario, se eligió la línea celular Jurkat que, como ya se comprobó en la **figura 11**, expresa CD9 en su superficie. En este caso se suprimió la expresión de CD9 utilizando un shRNA específico para esta tetraspanina (**Figura 22A y B**). La expresión ectópica de CD9 en las células HSB-2 reduce significativamente la adhesión celular mediada por LFA-1 a ICAM-1-Fc inmovilizado en plástico (**Figura 22C**), mientras que el silenciamiento de CD9 en las células Jurkat aumenta la adhesión dependiente de LFA-1 (**Figura 22D**). Estas células también se incubaron con los

RESULTADOS

AcMs anti-CD9 (VJ1/20, PAINS-10 y PAINS-13) y los tres anticuerpos tienen, en estas líneas celulares (linfocitos T), el mismo efecto inhibitorio en la adhesión celular mediada por LFA-1, que el observado previamente en las células macrofágicas THP-1/PMA y en la línea de linfocitos B JY. Este resultado confirma el efecto agonista de los anticuerpos sobre la función de CD9.

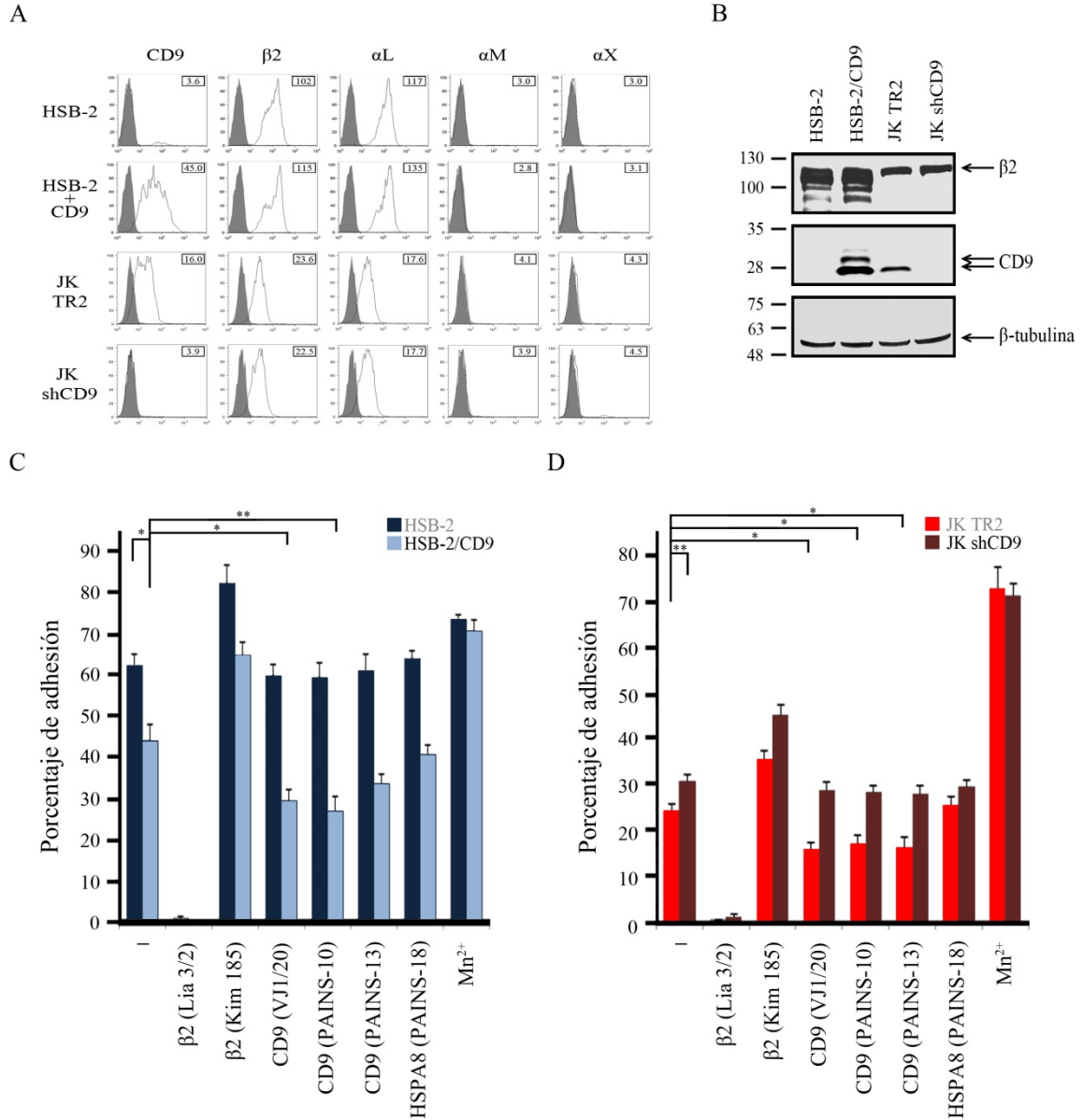


Figura 22: El silenciamiento o la expresión ectópica de CD9 regulan la adhesión mediada por LFA-1. **A)** y **B)** La neoexpresión de CD9 en las células HSB-2 se consiguió mediante transfección estable del plásmido pcDNA3-CD9 (HSB-2/CD9) y la inhibición de CD9 en las células Jurkat mediante transducción con retrovirus que contenían un shRNA específico para CD9 (JK shCD9). Las células Jurkat transducidas con un shRNA vacío (JK TR2) se utilizaron como control. La neoexpresión y el silenciamiento de CD9 en estas células se comprobaron mediante citometría de flujo (**A**) y *western-blot* (**B**). **C** y **D)** Las células HSB-2 (**C**) y Jurkat (**D**) se cargaron con la sonda BCECF-AM y se adhirieron durante 60 minutos a 37 °C a ICAM-1-Fc inmovilizado (12 µg/ml) en presencia de los anticuerpos indicados (20 µg/ml). Los gráficos muestran el porcentaje de adhesión celular (media ± ESM) de tres experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. *p<0,05 y **p<0,01.

CD9 no produce cambios en el estado de afinidad de la integrina LFA-1.

La capacidad adhesiva de las integrinas está regulada principalmente por dos mecanismos diferentes: por la alteración de la conformación de moléculas individuales de integrinas, (cambios en la afinidad) o por modificaciones en el estado de agregación de las moléculas de integrina que condiciona la valencia de sus interacciones con el ligando (cambios en la afeidez) (Carman y Springer, 2003; Stewart y Hogg, 1996). Para conocer por cuál de estos dos mecanismos CD9 inhibe la adhesión celular mediada por LFA-1, se analizó en primer lugar la inducción de la expresión del epítipo m24 por manganeso en líneas celulares que expresan o no CD9. El AcM m24 se une a un epítipo situado en el dominio βI de la subunidad $\beta 2$ que no se encuentra expuesto en la conformación plegada (baja afinidad por el ligando) o en la inducida por ésteres de forbol (conformación extendida – afinidad intermedia), pero sí que está expuesto en la conformación inducida por manganeso (conformación extendida y abierta – alta afinidad) (ver **Figura 8**) (Staunton y col., 2006). Como se puede observar en la **figura 23**, la expresión del epítipo m24 se indujo de manera similar con diferentes concentraciones de Mn^{2+} (desde 10 μM a 400 μM) en las células que tienen CD9 (HSB-2/CD9 y JK TR2) y en las células que no lo tienen (HSB-2 y JK shCD9 respectivamente). Este resultado indica que CD9 no parece estar regulando la afinidad de LFA-1.

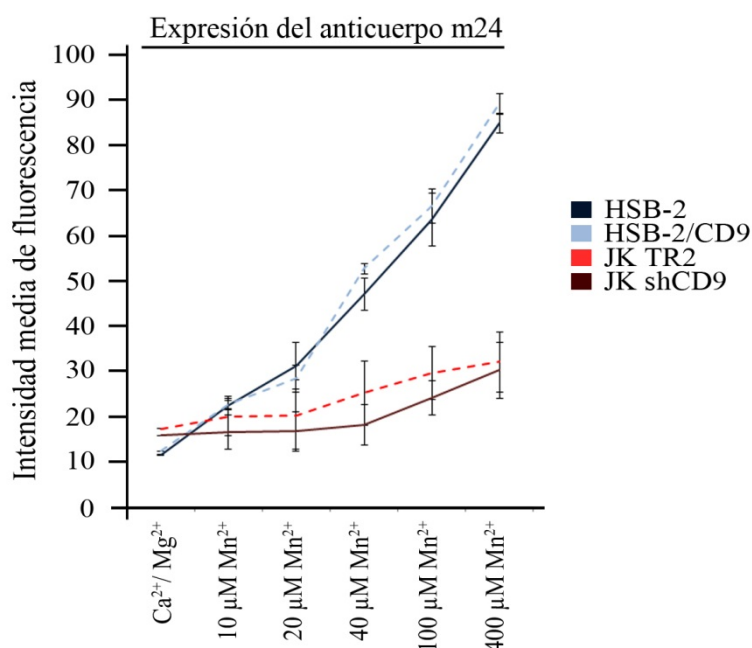


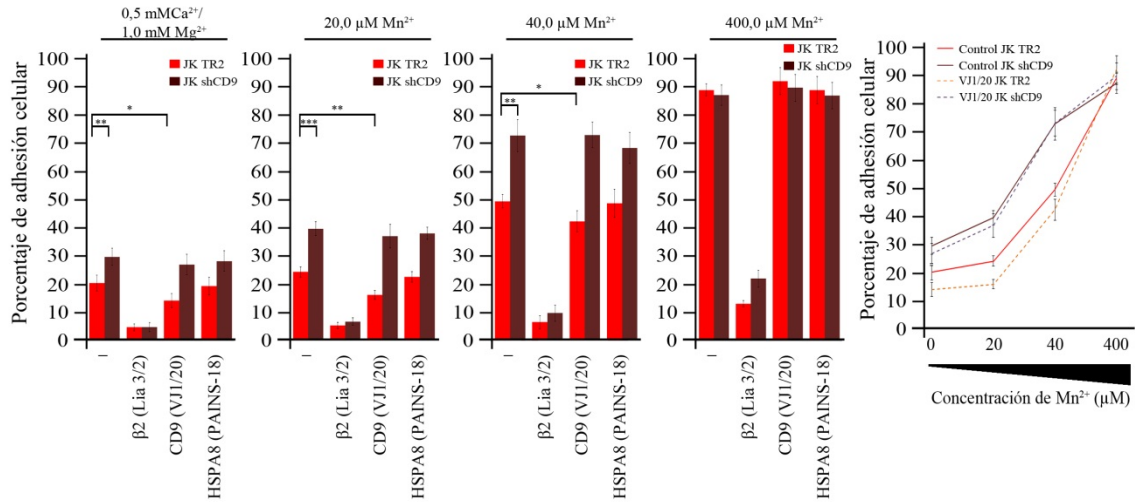
Figura 23: La presencia de CD9 no altera la afinidad de LFA-1. Análisis por citometría de flujo del aumento de la expresión del epítipo m24 en la superficie de las células HSB-2 (línea continua azul oscura), HSB-2/CD9 (línea discontinua azul clara), JK TR2 (línea discontinua roja) y JK shCD9 (línea continua rojo oscuro). La expresión de este epítipo se indujo agregando Mn^{2+} a distintas concentraciones (10, 20, 40, 100 y 200 μM). La expresión basal del m24 se obtuvo tratando a las células con 0,5 mM de Ca^{2+} y 1 mM de Mg^{2+} .

Como se mencionó en el apartado de introducción (ver apartado de “Activación de las integrinas”) el Mn^{2+} aumenta la adhesión mediada por las integrinas. En la **figura 20** se puede observar cómo al aumentar la concentración de Mn^{2+} en los experimentos de adhesión (de 20 μM a 400 μM) se produce un aumento progresivo de la adhesión celular mediada por la unión de LFA-1 a ICAM-1-Fc, tanto en las células Jurkat (**Figura 24A**) como en las HSB-2 (**Figura**

RESULTADOS

24B). Curiosamente, las diferencias en la adhesión entre las células que tienen y las que no tienen CD9 desaparecen cuando se somete a las células a la concentración más alta de Mn^{2+} (400 μM). Lo mismo ocurre cuando se trata a las células con el AcM anti-CD9 (VJ1/20), cuyo efecto inhibitorio sobre la adhesión dependiente de LFA-1 se mantiene con bajas concentraciones de Mn^{2+} pero en la concentración más alta este efecto desaparece. Estos resultados reflejan que CD9 no altera la adhesión de LFA-1 cuando ésta es mediada por moléculas de integrina en conformación extendida y abierta, es decir cuando LFA-1 está en un estado de alta afinidad por el ligando.

A



B

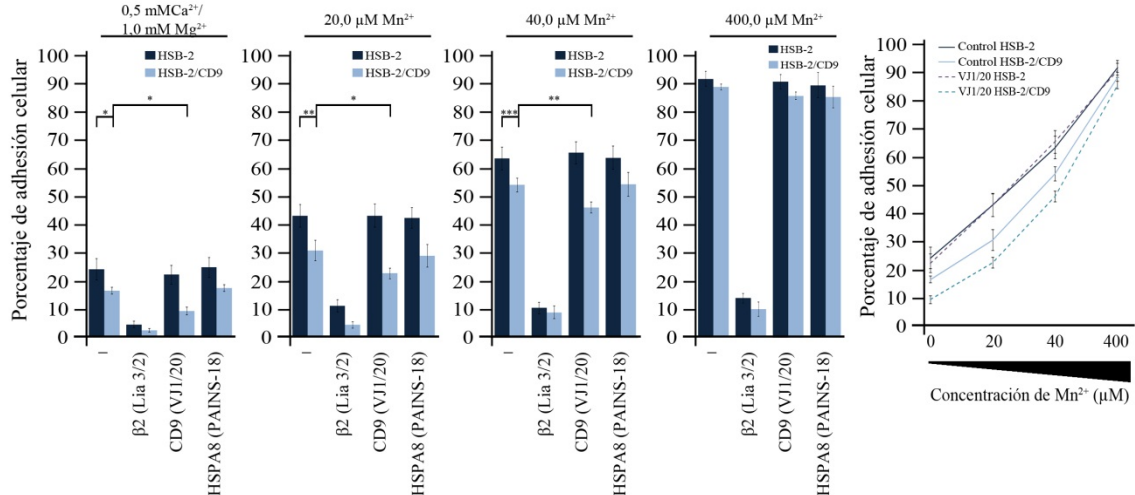


Figura 24: Efecto de CD9 en la adhesión mediada por LFA-1 en distintos estados de afinidad. Las células JK TR2 (barras rojas claras) y JK shCD9 (barras rojas oscuras) (A) y las células HSB-2 (barras azules oscuras) y HSB-2/CD9 (barras azules claras) (B) se cargaron con la sonda fluorescente BCECF-AM. Después, las células se trataron con distintas concentraciones de Mn^{2+} y se incubaron 45 minutos a 37 °C en pocillos de placas p96 recubiertos con ICAM-1-Fc (12 $\mu g/ml$), en presencia de los AcMs indicados (20 $\mu g/ml$). Cada panel muestra el porcentaje de células que permanecen adheridas después del lavado (medias \pm ESM de tres experimentos independientes, cada uno realizado en triplicados). Los gráficos de la derecha muestran un resumen de los datos de las adhesiones con las diferentes concentraciones de Mn^{2+} . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

CD9 regula la adhesión mediada por LFA-1 mediante cambios en el agrupamiento de la integrina.

Como CD9 no regula la adhesión celular mediada por LFA-1 mediante cambios en afinidad, el siguiente paso fue estudiar si CD9 afecta a la agregación de las moléculas de LFA-1 en la membrana plasmática, o lo que es lo mismo, si CD9 varía la afeidez de esta integrina. Con este objetivo se realizaron adhesiones tratando a las células con distintas concentraciones del éster de forbol PMA (50 o 200 ng/ml). Como se ha mencionado anteriormente, el PMA induce el estado de activación intermedio de LFA-1, pero también induce el agrupamiento de la

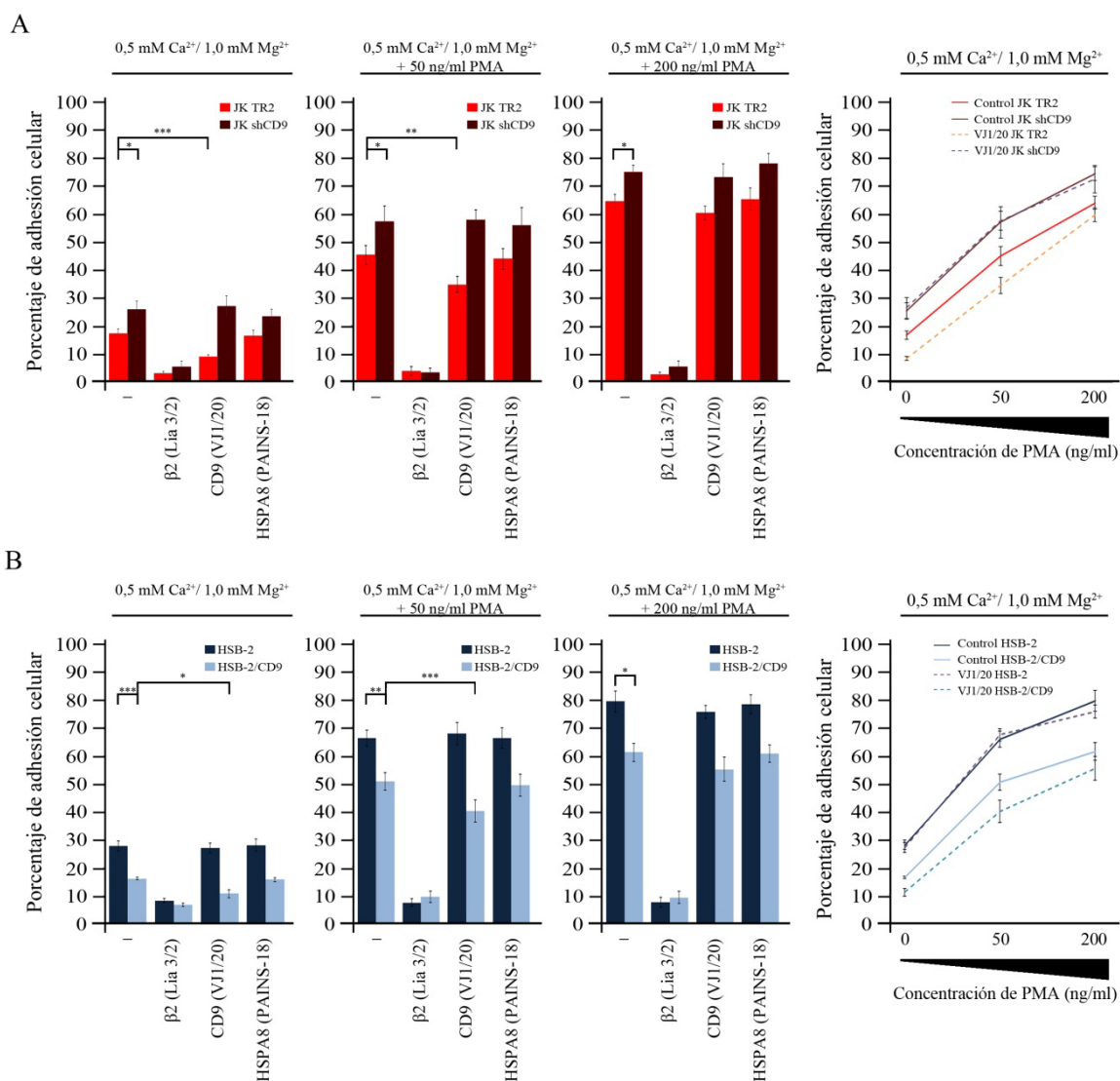


Figura 25: CD9 regula la adhesión de LFA-1 inducida por PMA. Las células JK TR2 (barras rojas claras) y JK shCD9 (barras rojas oscuras) (**A**) y las células HSB-2 (barras azules oscuras) y HSB-2/CD9 (barras azules claras) (**B**) se trataron 2 horas a 37 °C con distintas concentraciones de PMA (0, 50 o 200 ng/ml). Después, las células se cargaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se incubaron 45 minutos a 37 °C en pocillos de placas p96 recubiertos con ICAM-1-Fc (12 µg/ml) en presencia de los AcMs indicados (20 µg/ml). Las barras representan el porcentaje de células que permanecieron adheridas después del lavado (medias \pm ESM de tres experimentos independientes, cada uno realizado en triplicados). Los gráficos de la derecha muestran un resumen los datos de las adhesiones con los distintos tratamientos con PMA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

integrina cuando está su ligando presente (Carman y Springer, 2003). En estos experimentos, CD9 inhibe la adhesión mediada por LFA-1 incluso cuando se usa la dosis más alta de PMA (200 ng/ml) tanto en las células Jurkat (Figura 25A) como en las HSB-2 (Figura 25B), lo que sugiere que CD9 podría estar afectando al estado de agregación de LFA-1.

Las adhesiones presentadas hasta ahora son adhesiones estáticas, es decir, las células se añaden sobre pocillos de placas p96 de plástico que están recubiertos con ICAM-1-Fc. Con el objetivo de conseguir unas condiciones que se asemejen un poco más a las condiciones fisiológicas, se realizaron adhesiones en flujo. En estos ensayos las células Jurkat con y sin CD9 se trataron con 100 ng/ml de PMA durante 1 hora y se marcaron con dos sondas fluorescentes: las JK TR2 con CFSE (verde) y las JK shCD9 con CMAC (rojo). Las células marcadas se incubaron sobre ICAM-1-Fc 15 minutos y se las sometió a un flujo de medio de adhesión que comenzó en $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ y terminó en 20 dyn/cm^2 . En la figura 26 se puede observar que, en prácticamente todas las velocidades de flujo, permanecen adheridas en mayor número las células que no tienen CD9 (JK shCD9), lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en las adhesiones estáticas.

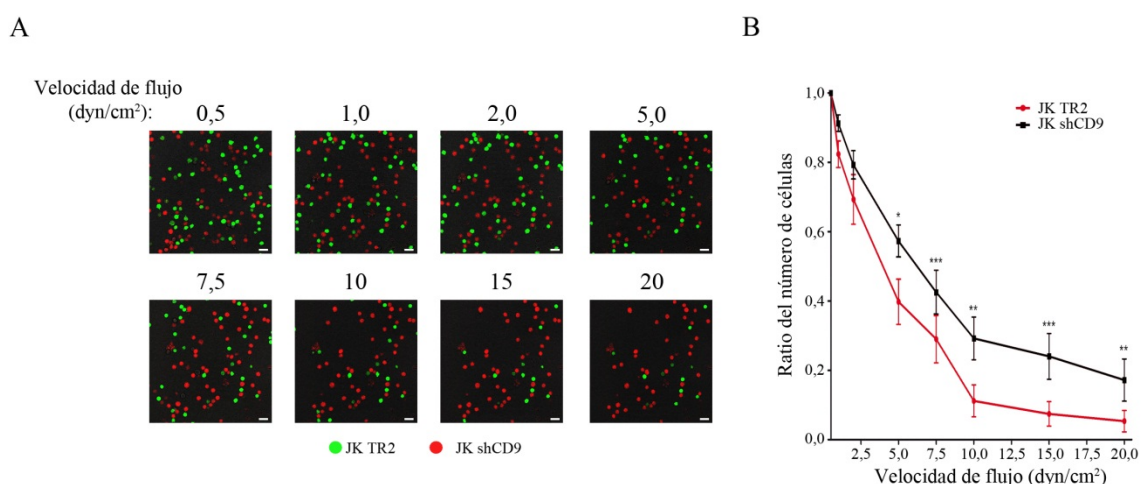


Figura 26: CD9 regula la adhesión en flujo dependiente de LFA-1. A) Las células JK TR2 y JK shCD9 se activaron con 100 ng/ml de PMA, se marcaron con las sondas CFSE (JK TR2) y CMAC (JK shCD9) y se dejaron adherir 15 minutos a ICAM-1-Fc antes de comenzar a aplicar el flujo de medio de adhesión. Se muestran paneles representativos de las células que permanecen adheridas en las distintas velocidades de flujo de medio que van desde $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ hasta 20 dyn/cm^2 . B) El gráfico muestra la media de las células que permanecen adheridas de 9 campos de microscopía diferentes para cada condición de flujo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Barra calibradora = $30 \mu\text{m}$.

La presencia de CD9 aumenta el número de agrupamientos de LFA-1 en la membrana plasmática pero reduce su tamaño.

Los resultados anteriores muestran que CD9 podría estar regulando a LFA-1 mediante cambios en el agrupamiento de la integrina sin modificar la afinidad de ésta a su ligando, es

RESULTADOS

decir, sin cambiar su conformación. Para profundizar en la implicación de CD9 en la regulación del agrupamiento de las moléculas de LFA-1, se cuantificó el número y el tamaño de estos agrupamientos en la superficie de adhesión a ICAM-1-Fc de células Jurkat tratadas con PMA que expresan CD9 (JK TR2) o que no lo expresan (JK shCD9). Con este objetivo, se sembraron células JK TR2 y JK shCD9 sobre placas Petri con fondo de cristal que previamente habían sido recubiertas con ICAM-1-Fc. Para permitir la adhesión, estas células se incubaron a 37 °C durante 90 minutos y, posteriormente, se realizaron tinciones simples de inmunofluorescencia con el AcM anti- $\beta 2$ TS1/18. En las imágenes de microscopía confocal que se muestran en la **figura 27**, se puede observar que el número de agrupamientos de la integrina LFA-1 inducidos por PMA en la superficie de contacto con el ligando, es significativamente mayor en las células que expresan CD9 (JK TR2, panel de la izquierda) que en aquellas que no lo expresan (JK shCD9, panel de la derecha). Cabe destacar que, aunque existan menos agrupamientos en las JK shCD9 éstos son de mayor tamaño que los que se observan en las células que tienen CD9.

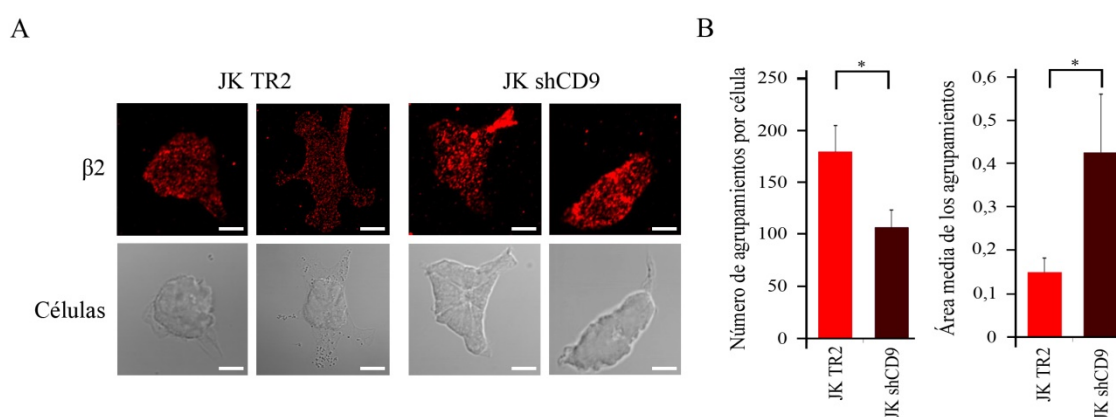
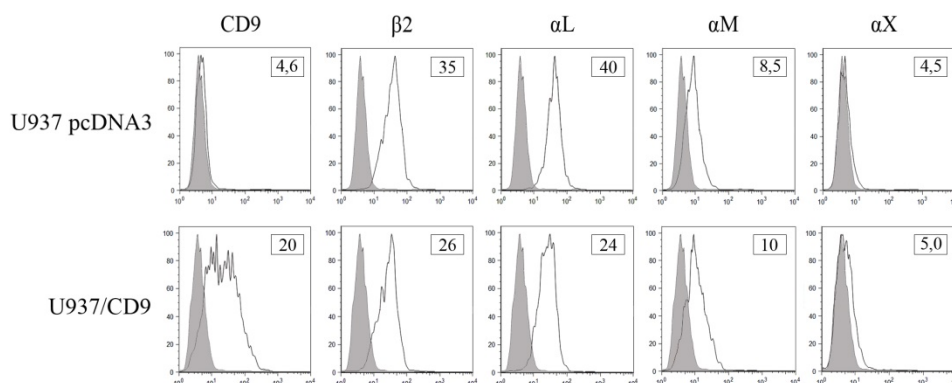


Figura 27: CD9 regula la distribución de las moléculas de LFA-1. A y B) Imágenes representativas de microscopía confocal de tinciones de $\beta 2$ (AcM TS1/18) en la superficie celular en contacto con el ligando ICAM-1-Fc (zona de adhesión) en células JK TR2 y JK shCD9 estimuladas con PMA. Barra calibradora = 5 μ m. **B)** Gráficos de cuantificación del número (gráfico de la izquierda) y el tamaño de los agrupamientos por célula (gráfico de la derecha). Los datos muestran la media de un total de 10 células individuales. * $p < 0,05$.

Este experimento se realizó también con otra línea celular leucocitaria, la línea monocítica U937. De modo similar a lo que ocurre en las THP-1, al tratar esta línea con PMA se produce su diferenciación de monocitos hacia células de tipo macrófago. Esta línea celular no expresa CD9 por lo que se hicieron transfecciones estables con los vectores pcDNA3 vacío y pcDNA3-CD9 para obtener células con (U937/CD9) y sin CD9 (U937 pcDNA3) (**Figura 28A**). Como se ha descrito anteriormente para las células Jurkat, en las células U937 estimuladas con PMA la presencia de CD9 afecta a la organización de la integrina LFA-1, induciendo un mayor número de agrupamientos en la superficie de adhesión de la célula a ICAM-1-Fc que tienen un menor tamaño (**Figura 28B**).

A



B

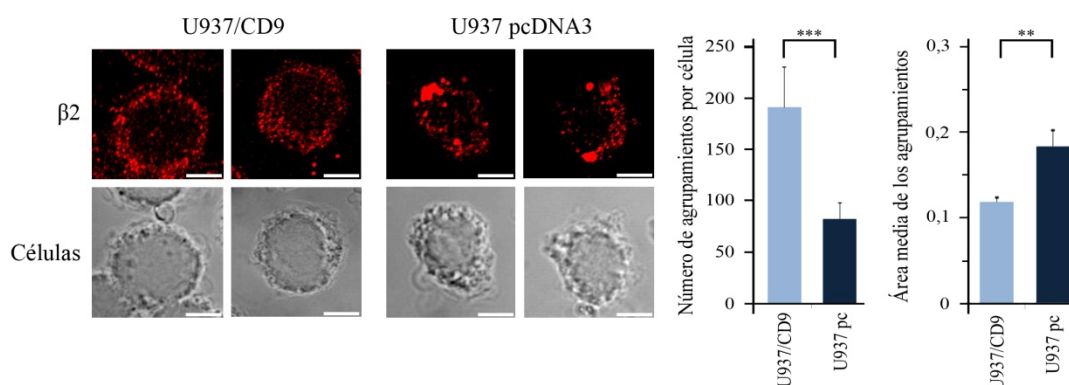
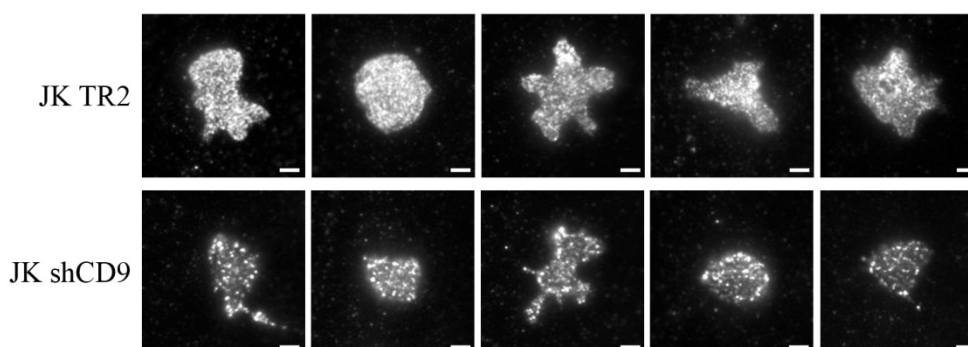


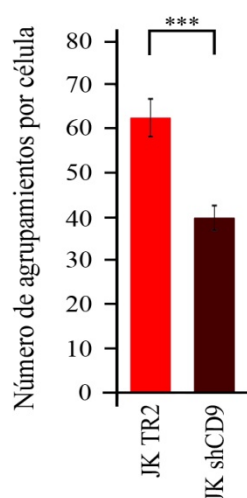
Figura 28: CD9 afecta a la organización de las moléculas de LFA-1 en células U937. A) La neoexpresión de CD9 en las células U937 se consiguió mediante transfección estable del plásmido pcDNA3-CD9 (U937/CD9). La expresión de CD9 en estas células se comprobó mediante citometría de flujo con el AcM anti-CD9 VJ1/20. El histograma gris representa la expresión del control negativo y el histograma blanco la expresión de la molécula indicada en la parte superior del gráfico. Los números del interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia. B) Imágenes representativas de microscopía confocal de los agrupamientos de LFA-1 en la superficie de contacto de la célula con el ligando ICAM-1-Fc (zona de adhesión) en células U937 estimuladas con PMA con (imágenes de la izquierda) y sin CD9 (imágenes de la derecha). Los gráficos muestran la cuantificación del número (gráfico de la izquierda) y del tamaño de los agrupamientos por célula (gráfico de la derecha). Los datos representan la media del tamaño o del área de un total de 10 células individuales. Barra calibradora = 5 μ m. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Estos resultados se comprobaron por microscopía TIRF que permite visualizar, con alta resolución y un alto ratio señal/ruido, la organización de las moléculas de la superficie celular localizadas específicamente en el área de contacto con el sustrato. Para este experimento se utilizaron células JK TR2 y JK shCD9 estimuladas con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas. Estas células se sembraron sobre cristales recubiertos con ICAM-1-Fc y se dejaron adherir 90 minutos antes de realizar la tinción de inmunofluorescencia con el AcM TS1/18. Como en el caso de la microscopía confocal, las imágenes obtenidas mediante TIRF muestran que las células que expresan CD9 (JK TR2) tienen un mayor número de agrupamientos de LFA-1 pero éstos tienen un tamaño más pequeño que las células que no tienen CD9 (JK shCD9). Además, las células que tienen CD9 presentan más moléculas de LFA-1 aparentemente dispersas (que no forman agrupamientos). (Figura 29).

A



B



C

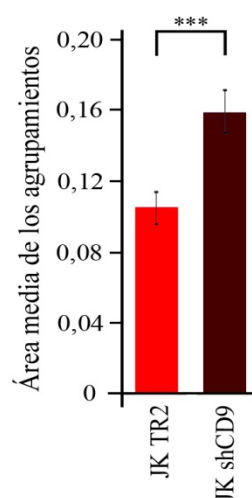


Figura 29: Análisis de los agrupamientos de LFA-1 dependientes de CD9 por microscopía TIRF. A) Imágenes representativas de los agrupamientos de $\beta 2$ formados en la zona de adhesión a ICAM-1-Fc obtenidas mediante microscopía TIRF. Las células JK TR2 y JK shCD9 se estimularon con PMA y se dejaron adherir 90 minutos sobre ICAM-1-Fc antes de realizar la tinción de inmunofluorescencia con el anticuerpo TS1/18 (anti- $\beta 2$). Barra calibradora = 5 μ m. B) y C) Gráficos de la cuantificación del número de agrupamientos por célula (B) y del tamaño de los agrupamientos (C). Los datos son la media \pm ESM del número y del área de los agrupamientos de 15 células individuales. *** $p < 0,001$.

CD9 afecta a la extracción de LFA-1 de la membrana plasmática.

Para entender mejor cómo CD9 afecta a la organización de LFA-1 en la superficie celular de los leucocitos, se midió la resistencia a la extracción, con distintas concentraciones de detergente, de las moléculas de LFA-1. Las células JK TR2 y JK shCD9 estimuladas con PMA se lisaron con distintas concentraciones del detergente Tritón-X100 (desde 0,02 hasta 0,5 % de Tritón-X100 en el tampón de lisis) y se realizó un *western-blot* con el anticuerpo MEM-48 para observar la resistencia a la extracción de $\beta 2$. Como se puede apreciar en la **figura 30**, las moléculas de LFA-1 se extraen más fácilmente cuando se expresa CD9 en la superficie celular, lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente que indican que hay un aumento de

RESULTADOS

la cantidad de LFA-1 disperso en estas células y que el LFA-1 agrupado forma complejos más pequeños que en el caso de las células que no presentan CD9 en su superficie.

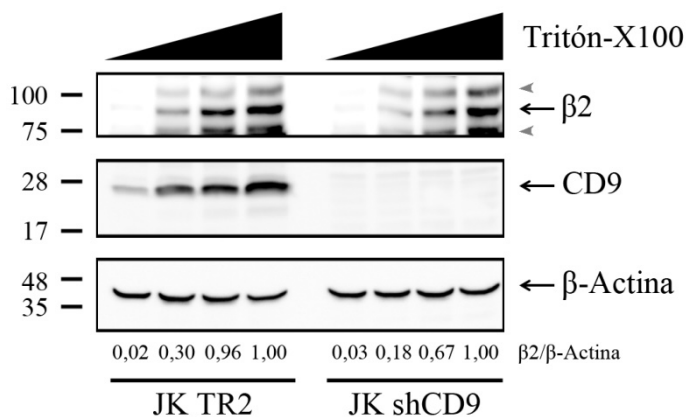


Figura 30: La presencia de CD9 altera la resistencia a la extracción de LFA-1. Las células JK TR2 y JK shCD9 tratadas con PMA se incubaron 45 minutos en placas recubiertas con ICAM-1-Fc. Después, se lisaron las células con distintas concentraciones del detergente Tritón-X100 (0,02; 0,05; 0,1 y 0,5 %). La cantidad de LFA-1 extraída se analizó por *western-blot* con el anticuerpo anti- $\beta 2$ MEM-48. La cuantificación de $\beta 2$ mostrada en la parte inferior del panel es relativa a la proteína que se utilizó como control (β -Actina).

En conjunto, los resultados de microscopía confocal y TIRF, junto con la extracción bioquímica, muestran que CD9 regula la organización de las moléculas de LFA-1 en la membrana plasmática, como se puede comprobar por las diferencias existentes en el número y el tamaño de los agregados de LFA-1 entre las células que expresan y las que no expresan CD9, así como por las diferencias en la resistencia a la extracción con detergentes.

DISCUSIÓN

La tetraspanina CD9 es una proteína de transmembrana que se encuentra ampliamente distribuida en diversos tipos de células, entre los que se incluyen leucocitos, células tumorales, vasculares y neuronales. CD9 interacciona con varios miembros de las subfamilias $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ de las integrinas y, a través de estas interacciones, regula la adhesión, la migración y la señalización celular (Bassani y Cingolani, 2012; Berditchevski, 2001). Sin embargo, hasta ahora no se había descrito la existencia de una interacción funcional entre CD9 y miembros de la subfamilia $\beta 2$. Por otra parte, sí se había descrito una interacción funcional entre CD81 (una tetraspanina que comparte el 45 % de identidad con CD9 (Charrin y col., 2014)) y la integrina LFA-1 en linfocitos T (VanCompernelle y col., 2001). En esta tesis se describe por primera vez la interacción de CD9 con una integrina perteneciente a la subfamilia $\beta 2$, LFA-1. El estudio de la colocalización de estas moléculas, los ensayos de hibridación por proximidad y los ensayos bioquímicos de co-inmunoprecipitación, entrecruzamiento químico y *pull-down*, demuestran la interacción de CD9 y LFA-1 en la membrana de diferentes tipos de líneas celulares leucocitarias entre las que se incluyen linfocitos T (Jurkat) y B (JY) y macrófagos (THP-1 diferenciadas con PMA). La interacción de CD9 con LFA-1 parece ser directa o primaria, puesto que mantienen su interacción, en inmunoprecipitaciones, experimentos de *pull-down* y de entrecruzamiento químico, cuando se lisan las células con detergentes como el Tritón-X100. Hay que destacar que la señal de colocalización, tanto en las inmunofluorescencias como en los ensayos de hibridación por proximidad, es mayor en la zona de contacto entre dos células THP-1 cuando éstas se diferencian con PMA. En estas zonas de contacto se produce un enriquecimiento en moléculas de LFA-1 que se están uniendo a su ligando ICAM-1, presente en la otra célula. La colocalización de CD9 con LFA-1 en esta zona parece indicar que CD9 podría estar participando en la adhesión de LFA-1 a ICAM-1.

La mayoría de las interacciones que se han descrito entre las tetraspaninas y las integrinas se producen a través de la región variable del dominio extracelular grande (LEL) de las tetraspaninas (Charrin y col., 2009; Yauch y Hemler, 2000). Por ejemplo, la segunda mitad del dominio LEL de CD151 es necesaria y suficiente para conferir estabilidad a la asociación con la integrina $\alpha 3 \beta 1$. Si se producen mutaciones en los residuos de cisteína de los motivos conservados CCG y PxxCC, presentes en el dominio LEL de CD151, se impide la asociación directa de esta tetraspanina con $\alpha 3 \beta 1$ (Berditchevski y col., 2001). Los ensayos de *pull-down*, con una construcción quimérica del dominio LEL de CD9, realizados en esta tesis, muestran que la interacción de LFA-1 con CD9 se realiza también a través de este dominio.

El siguiente paso después de comprobar que existe una interacción entre CD9 y LFA-1, fue investigar si CD9 tiene un efecto funcional sobre la adhesión de esta integrina a su ligando ICAM-1. En un primer abordaje, se realizaron adhesiones tratando a las células con tres anticuerpos monoclonales que reconocen CD9 (VJ1/20, PAINS10 y PAINS13). Estos

anticuerpos son agonistas de la función de CD9 como se ha demostrado anteriormente, puesto que los efectos funcionales que se producen en las células que son tratadas con estos anticuerpos son los mismos que los que ocurren al sobre-expresar CD9 en las células y opuestos a los observados cuando se silencia esta tetraspanina (Gilsanz y col., 2013; Gutiérrez-López y col., 2011; Ovalle y col., 2007). De manera similar, en los experimentos realizados en este trabajo se observa que el uso de los anticuerpos y la sobreexpresión de CD9 producen el mismo efecto inhibitorio sobre la adhesión celular mediada por LFA-1. Además, el silenciamiento de CD9 en las células Jurkat produce un aumento de la adhesión respecto a las células que sí expresan CD9, lo que confirma que CD9 ejerce un efecto inhibitorio en la adhesión mediada por esta integrina. El mismo efecto se puede observar en un modelo más dinámico de interacción de LFA-1 con su ligando, la muerte celular mediada por linfocitos T citotóxicos. Cuando se trata a los linfocitos T con IL-2, algunos se diferencian a linfocitos T citotóxicos capaces de unirse a las células diana (Daudi). Tras el reconocimiento específico de las células diana, se produce una interacción de gran avidez entre las moléculas de LFA-1 del linfocito T citotóxico y las moléculas de ICAM-1 de la célula diana. Esta unión fuerte permite la liberación de granulosomas (que contienen perforina) por parte de los linfocitos T, que al fusionarse con la membrana de la célula diana abren canales que pueden provocar la lisis osmótica de la célula diana. En este proceso, clave para la inmunidad, CD9 tiene un papel importante, puesto que si se usan los anticuerpos anti-CD9 se inhibe la muerte celular mediada por los linfocitos T. CD9 podría estar afectando a la unión de LFA-1 con su ligando haciendo que disminuya la fuerza de la interacción entre el linfocito T y la célula diana.

Otras tetraspaninas como CD81 y CD82 tienen el efecto contrario sobre la adhesión de LFA-1, puesto que la sobreexpresión de estas moléculas en las células aumenta la capacidad de adhesión de LFA-1 a ICAM-1 (Shibagaki y col., 1999; VanCompernelle y col., 2001). Es posible que las diferencias en el efecto de las distintas tetraspaninas sobre la adhesión mediada por LFA-1 se deba al ligando que se está usando. En los experimentos realizados con otras tetraspaninas se ha estudiado la adhesión de LFA-1 a ICAM-3, mientras que en este trabajo se ha analizado la regulación que ejerce CD9 sobre la adhesión de LFA-1 a ICAM-1. Otra posibilidad es que esta regulación diferencial dependa del tipo celular en el que se realizan los experimentos. La asociación de la tetraspanina CD82 con las integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ depende del estado de glicosilación tanto de la tetraspanina como de las integrinas, y el grado de glicosilación de CD82 varía en distintos tipos celulares. De este modo, el grado de glicosilación puede representar un mecanismo de control tejido específico que regula la unión de los complejos CD82- $\alpha 3\beta 1$ y CD82- $\alpha 5\beta 1$ (Berditchevski, 2001; Ono y col., 2000). Aunque quizá la explicación más probable del papel diferencial de CD9 respecto a otras tetraspaninas en la adhesión a LFA-1, sea la importancia que tiene LFA-1 en varios procesos celulares que

requieren adhesión celular (como la extravasación a tejidos, la organización de la sinapsis inmunológica, la presentación de antígenos, la colaboración entre linfocitos y la muerte mediada por linfocitos T citotóxicos), lo que hace que esta integrina tenga que ser finamente regulada por distintas moléculas y en sentidos opuestos.

Como se ha comentado anteriormente, la capacidad de adhesión de las integrinas se regula fundamentalmente por dos mecanismos: cambios en la afinidad de las moléculas (cambios conformacionales) o cambios de su agrupamiento en la superficie celular que regulan la valencia de la interacción de la integrina con su ligando (ver **Figura 8**). CD9 no regula a LFA-1 mediante cambios en su afinidad por el ligando. Como se puede observar en el análisis de la expresión del epítipo m24, la conformación de alta afinidad de LFA-1 inducida por manganeso, no varía en función de que las células expresen o no CD9. Del mismo modo, no se ven cambios en la adhesión celular mediada por LFA-1 cuando ésta se estimula con 400 μM de manganeso entre células con y sin CD9 en su superficie. Sin embargo, a bajas concentraciones de manganeso (entre 20 y 40 μM), sí que existen diferencias entre las células que tienen CD9 y las que no lo tienen, presentando menor adhesión aquellas que tienen CD9. Cabe destacar que, a altas concentraciones, el manganeso por sí solo induce una mezcla de conformaciones de la integrina (es decir, LFA-1 se encontraría en distintos estados de afinidad), pero cuando el ligando está presente en condiciones saturantes, junto con el manganeso a altas concentraciones, la integrina se encuentra casi exclusivamente en conformación abierta de alta afinidad (Carman y Springer, 2003). La diferencia del efecto de CD9 en la adhesión, entre las diferentes concentraciones de manganeso, seguramente se deba a que a bajas concentraciones de manganeso sólo una pequeña cantidad de moléculas de LFA-1 están en el estado de alta afinidad, mientras que a altas concentraciones de manganeso todas las moléculas de LFA-1 se encuentran en estado de alta afinidad por el ligando lo que produce una interacción muy fuerte que CD9 no es capaz de inhibir.

El PMA induce el estado de afinidad intermedia de LFA-1 y la formación de agrupamientos de la integrina en la membrana plasmática cuando el ligando está presente. Cuando se trata a las células con PMA, se mantiene la inhibición de la adhesión CD9 incluso a la concentración más alta, lo que parece indicar que CD9 podría estar regulando el agrupamiento de la integrina en la superficie celular. Las imágenes de microscopía confocal y microscopía TIRF de los agrupamientos de $\beta 2$ muestran como CD9 afecta a la distribución de las integrinas en la superficie de contacto con el ligando ICAM-1. Las células que tienen CD9 muestran un mayor número de agrupamientos de LFA-1 pero éstos son más pequeños que los que existen en las células que no tienen CD9. Además, en los experimentos con microscopía TIRF se puede apreciar cómo en las células que tienen CD9 aparecen moléculas de LFA-1 dispersas que, aparentemente, no están formando agrupamientos en la membrana. Este patrón de

moléculas de LFA-1 aparentemente dispersas podría corresponder a los nanoagrupamientos (*nanoclusters*) de LFA-1 que han sido caracterizados por técnicas de microscopía de alta resolución en células THP-1 (Bakker y col., 2012). Según este estudio, las moléculas de LFA-1 están pre-organizadas en nanoagrupamientos en la membrana de los monocitos. Estos nanoagrupamientos pueden desplazarse por la membrana y poseen un pequeño número de moléculas de LFA-1 en conformación activa (alrededor de un 5 %) que están ancladas al citoesqueleto. La unión del ligando favorece la movilidad lateral de LFA-1 y la agregación en la zona de contacto con el ligando de los nanoagrupamientos para formar microagrupamientos (*microclusters*) que permiten la unión de LFA-1 a su ligando y, por tanto, la adhesión celular. Por todo ello, se puede especular que CD9 puede tener un papel importante regulando las transiciones entre los distintos estados de organización/agregación de la integrina LFA-1 en la membrana celular de los leucocitos. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que CD9 esté impidiendo de algún modo que los nanoagrupamientos de LFA-1 se unan para formar microagrupamientos. Algunas tetraspaninas, entre las que se encuentran CD9 y CD81, se pueden unir a los microfilamentos de actina a través de las proteínas ERM (ezrina, radixin y moesina), ya sea por unión directa a estas proteínas (como en el caso de CD81) o mediante su asociación a las proteínas EWI-2 y EWI-F (Sala-Valdés y col., 2006). Es posible que la movilidad de las moléculas de LFA-1 se vea restringida por la unión de CD9 a LFA-1 y, a su vez, de CD9 con el citoesqueleto, inhibiendo así la formación de macroagrupamientos y, por lo tanto, reduciendo la capacidad de adhesión mediada por un aumento de la avidéz de esta integrina.

El esquema que se presenta en la **figura 31** es un modelo que integra los efectos de CD9 sobre LFA-1 de acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis. En los linfocitos en estado de reposo que circulan por la sangre, LFA-1 presenta un estado de baja afinidad por el ligando (conformación plegada) y se encuentra dispersa por la superficie celular (baja valencia de interacción con el ligando). Además, estos linfocitos en reposo se caracterizan por la baja expresión de CD9 o incluso por la ausencia de su expresión (**panel 1**) (Berendt y col., 1992; Stewart y Hogg, 1996). Cuando se trata a las células con PMA aumenta la capacidad de difusión de las moléculas en la membrana y LFA-1 puede formar agregados en la superficie celular cuando el ligando está presente (alta valencia de interacción con el ligando). Además, el PMA induce en la integrina un estado de afinidad intermedia (conformación estirada con las colas citoplasmáticas juntas) (**panel 2**). Ambos sucesos provocan que al tratar las células con PMA aumente la adhesión celular dependiente de LFA-1 a su ligando ICAM-1. Si, en este contexto, se aumentan los efectos de CD9 mediante su neoexpresión o mediante el uso de anticuerpos agonistas de su función (no mostrado en el esquema), se altera la organización de las moléculas de LFA-1 en la superficie celular, aumentando el número de moléculas de LFA-1 dispersas

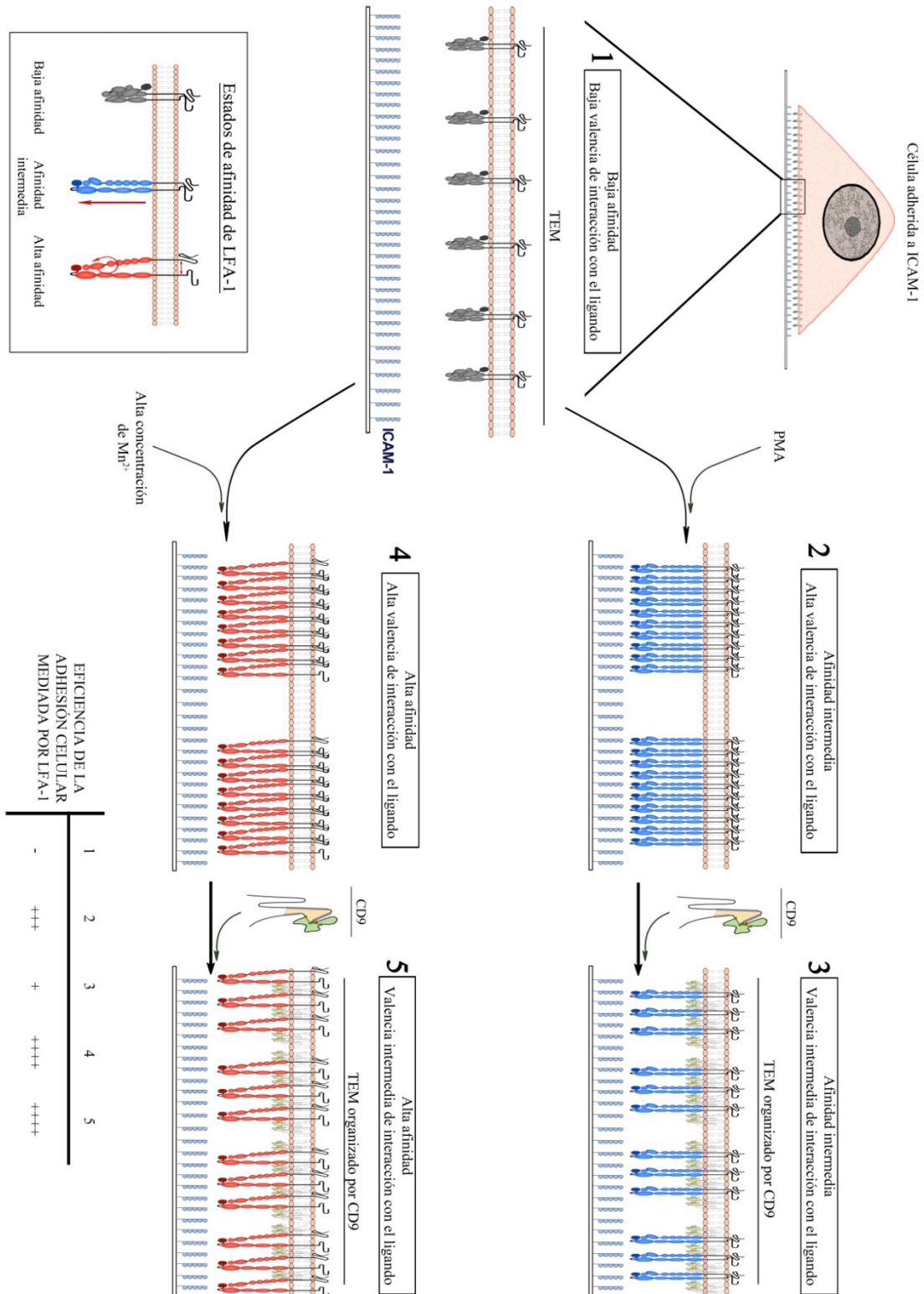


Figura 31: Modelo hipotético de regulación por CD9 de la adhesión mediada por LFA-1. 1. Los linfocitos T en reposo expresan LFA-1 en conformación inactiva y dispersa por la superficie celular. 2. La activación con PMA induce la conformación de afinidad intermedia y el agrupamiento de las moléculas de LFA-1, lo que conduce a un aumento de la valencia de interacción con el ligando ICAM-1. 3. En el contexto de un TEM organizado por CD9 (como resultado de la neoexpresión de CD9), el PMA induce el agrupamiento de la integrina pero la presencia de CD9 produce que el agrupamiento sea menos favorable para la interacción con el ligando. 4. Al activar las moléculas de LFA-1 con altas concentraciones de Mn^{2+} , éste induce la conformación de alta afinidad de LFA-1 así como su agrupamiento, lo que produce un aumento de la valencia de interacción con el ligando. 5. La neoexpresión de CD9 en este caso puede afectar al agrupamiento de la integrina, produciendo agrupamientos de menor tamaño, y disminuyendo el número de moléculas que interaccionan con el ligando. Sin embargo, al estar las integrinas en estado de alta afinidad, este cambio en los agrupamientos no afecta a su capacidad de adhesión al ligando. En la parte inferior de la figura se muestra un resumen de la eficiencia de la adhesión en cada una de las situaciones.

(posiblemente organizadas en nanoagrupamientos) y reduciendo el tamaño de los agregados de LFA-1 aunque incrementándose el número de éstos (**panel 3**). En esta situación, la adhesión sería mayor que en la situación reflejada en el **panel 1**, puesto que las integrinas presentan un estado de afinidad intermedio en el que tienen mayor afinidad por el ligando que las integrinas en conformación plegada. Por el contrario, la adhesión sería menor que la que existiría en la situación del **panel 2**, ya que las moléculas de LFA-1 estarían formando agrupamientos de menor tamaño y con menor valencia de interacción con el ligando. Por otro lado, cuando se trata a las células con una alta concentración de manganeso se produce un cambio conformacional en las moléculas de LFA-1 hacia un estado de alta afinidad por el ligando (conformación estirada con colas citoplasmáticas separadas). Además, el manganeso también favorece la formación de agregados de esta integrina con lo que adquiere una mayor valencia de interacción con el ligando (**panel 4**). Ambos sucesos, alta afinidad y alta valencia de interacción con el ligando, hacen que al tratar las células con altas concentraciones de manganeso aumente mucho la capacidad de adhesión. Si, en esta situación, se neoexpresa CD9 o se utilizan los anticuerpos agonistas se puede producir una disminución del tamaño de los agrupamientos de LFA-1 pero, según los resultados obtenidos, esta disminución del tamaño no va acompañada por un descenso detectable en la capacidad adhesiva de LFA-1 (**panel 5**). Es posible que, al estar todas las moléculas de la integrina en un estado de alta afinidad, el efecto de CD9 en la distribución de las moléculas de LFA-1 no sea lo suficientemente potente para disminuir la adhesión de las moléculas de LFA-1 al ligando ICAM-1. El efecto inhibitorio de CD9 sobre la adhesión mediada por LFA-1 (transición entre el estado reflejado en el panel 2 y el del panel 3) hace que CD9 pueda ser una nueva diana terapéutica para poder reducir la actividad de LFA-1, lo que sería muy útil en diversas enfermedades inflamatorias.

La tetraspanina CD9 regula también la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ a una proteína de la matriz extracelular, la fibronectina. Curiosamente, al tratar a las células THP-1/PMA o a los linfoblastos con los tres anticuerpos anti-CD9 se observa que éstos aumentan la adhesión mediada por integrinas de la subfamilia $\beta 1$, lo que concuerda con experimentos anteriores realizados en células de carcinoma colorrectal (Ovalle y col., 2007). De este modo, parece que CD9 tiene un doble papel en la regulación de la adhesión en los leucocitos, favoreciendo la adhesión de las integrinas $\beta 1$ a fibronectina e inhibiendo la adhesión de LFA-1 a ICAM-1. Se ha descrito que existe un control recíproco de la actividad de algunos miembros de las distintas subfamilias de integrinas cuando estos se co-expresan en la misma célula. Por ejemplo, en algunas líneas de linfocitos T, la integrina $\alpha 4\beta 1$ sólo está funcionalmente activa, es decir, sólo se une a su ligando VCAM-1, cuando LFA-1 está inactiva o no se expresa (van Kooyk y col., 1993). De manera similar, en los linfoblastos T humanos la inducción de la activación de la integrina LFA-1 provoca un descenso en la adhesión mediada por las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, lo

que produce que las células tengan un fenotipo menos adhesivo y favoreciendo así la migración de las células (Porter y Hogg, 1997). Algo parecido ocurre en la línea celular eritroleucémica K562 transfectada con la integrina $\alpha\beta 3$. En este caso la presencia de la subunidad $\beta 3$ de la integrina inhibe la fagocitosis mediada por fibronectina dependiente de la integrina $\alpha 5\beta 1$ endógena (Blystone y col., 1994). Sin embargo, los mecanismos por los que ocurre este tipo de regulación son desconocidos.

La asociación con el citoesqueleto es clave para la regulación de la actividad de las integrinas y para la adhesión mediada por éstas. Curiosamente, el citoesqueleto de actina parece jugar un papel diferencial en el control de la función de las subfamilias de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$. En este sentido, en leucocitos en reposo las moléculas de LFA-1 se mantienen en un estado inactivo con baja avidéz a través de su asociación con los microfilamentos de actina y la liberación de su anclaje al citoesqueleto, causada por drogas como la citocalasina D o latrunculina B que rompen este anclaje, aumentan la adhesión de LFA-1 a células que expresan ICAM-1 (Kucik y col., 1996; van Kooyk y Figdor, 2000). Por el contrario, la mayoría de las integrinas $\beta 1$ (con la excepción de la interacción de la integrina $\alpha 4\beta 1$ con VCAM-1) tienen adhesiones más estables a componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, el colágeno o la laminina, y por este motivo parecen requerir uniones más fuertes con los componentes del citoesqueleto. En este caso, si se eliminan las proteínas ERM (proteínas que se unen a la actina) se reduce la adhesión de las integrinas $\beta 1$ a la fibronectina (Berrier y Yamada, 2007; Chen y col., 2013; Sánchez-Mateos y col., 1996). Como se ha comentado anteriormente, CD9 interacciona con las proteínas EWI-2 y EWI-F y éstas a su vez se unen a las proteínas ERM de anclaje a actina, haciendo que CD9 se asocie con el citoesqueleto. Por otro lado, CD9 también puede asociarse con las formas convencionales de PKC y puede reclutarla a los TEMs junto con las integrinas. Se sabe que las formas convencionales de PKC regulan el citoesqueleto de actina, por lo que también podría estar afectando a la fuerza de la adhesión mediada por las integrinas (Hemler, 2005). El hecho de que CD9 pueda modular de manera opuesta la función adhesiva de las integrinas $\beta 2$ y $\beta 1$ apunta a que los TEMs en los que está CD9 tienen un papel importante en esta regulación diferencial. Una hipótesis atractiva es que, mediante el refuerzo de las uniones del citoesqueleto con la integrina, CD9 puede restringir la difusión lateral por la membrana de las moléculas de LFA-1, provocando un efecto inhibitorio de su función adhesiva. Al mismo tiempo, mediante esta unión al citoesqueleto, CD9 puede estar estabilizando a las integrinas $\beta 1$ con el consiguiente aumento de la adhesión a los componentes de la matriz extracelular. Haría falta una investigación más profunda para estudiar esta hipótesis.

En resumen, los datos que se han presentado en esta tesis demuestran que la tetraspanina CD9 se asocia con la integrina LFA-1 en diferentes tipos de leucocitos y, a través de estas interacciones, CD9 ejerce un efecto inhibitorio sobre la función adhesiva de LFA-1 y sobre la

citotoxicidad celular mediada por esta integrina. El mecanismo responsable de la regulación negativa que ejerce CD9 sobre LFA-1 no implica cambios en el estado de afinidad de la integrina pero sí altera su agregación en la membrana plasmática. Sorprendentemente, CD9 regula de manera inversa la adhesión de las integrinas de las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 2$ expresadas en los mismos leucocitos. Estos datos contribuyen al entendimiento de la regulación de la actividad adhesiva de LFA-1, una integrina que tiene un papel muy importante en muchas de las funciones leucocitarias que requieren adhesión intercelular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados que se han obtenido en esta tesis se resumen en las siguientes conclusiones:

1. La tetraspanina CD9 interacciona con la integrina LFA-1 en la membrana plasmática de diferentes líneas celulares leucocitarias humanas: macrófagos, linfocitos T y linfocitos B.
2. La interacción entre CD9 y LFA-1 es de naturaleza directa y se produce a través del dominio extracelular grande (LEL) de la tetraspanina.
3. A través de ésta interacción, CD9 inhibe la adhesión celular mediada por la unión de LFA-1 a su ligando ICAM-1 y la citotoxicidad celular dependiente de esta integrina.
4. La regulación de CD9 sobre LFA-1 no afecta a la afinidad de la integrina pero sí a la distribución de ésta en la membrana plasmática. CD9 favorece la formación de pequeños agregados de LFA-1 reduciendo la valencia de la interacción con el ligando.
5. La tetraspanina CD9 regula inversamente la adhesión mediada por integrinas de las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 2$ en las células leucocitarias.

A decorative frame resembling a scroll, with a light gray background and a dark gray border. The frame has a vertical strip on the left side and rounded corners. The word "BIBLIOGRAFÍA" is centered within the frame.

BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A., and Underhill, D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*. 17:593-623.
- Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. 2005. Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:6437-6442.
- Anzai, N., Lee, Y., Youn, B.S., Fukuda, S., Kim, Y.J., Mantel, C., Akashi, M., and Broxmeyer, H.E. 2002. C-kit associated with the transmembrane 4 superfamily proteins constitutes a functionally distinct subunit in human hematopoietic progenitors. *Blood*. 99:4413-4421.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Le Naour, F. 2008. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol*. 181:7002-7013.
- Arroyo, A.G., García-Pardo, A., and Sánchez-Madrid, F. 1993. A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti-beta 1 chain monoclonal antibody. *J Biol Chem*. 268:9863-9868.
- Azorsa, D.O., Hyman, J.A., and Hildreth, J.E. 1991. CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491. *Blood*. 78:280-284.
- Bakker, G.J., Eich, C., Torreno-Pina, J.A., Diez-Ahedo, R., Perez-Samper, G., van Zanten, T.S., Figdor, C.G., Cambi, A., and García-Parajo, M.F. 2012. Lateral mobility of individual integrin nanoclusters orchestrates the onset for leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:4869-4874.
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Sala-Valdés, M., Gutiérrez-López, M.D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P.N., Cabañas, C., and Sánchez-Madrid, F. 2005. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*. 105:2852-2861.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yáñez-Mó, M., Tejera, E., López-Romero, P., Monk, P.N., Gratton, E., Caiolfa, V.R., and Sánchez-Madrid, F. 2008. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol*. 183:527-542.
- Bassani, S., and Cingolani, L.A. 2012. Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 44:703-708.
- Berdichevski, F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*. 114:4143-4151.
- Berdichevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M.R., Fitter, S., Ashman, L., and Jenner, S.J. 2001. Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem*. 276:41165-41174.
- Berdichevski, F., Odintsova, E., Sawada, S., and Gilbert, E. 2002. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem*. 277:36991-37000.
- Berdichevski, F., Zutter, M.M., and Hemler, M.E. 1996. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell*. 7:193-207.
- Berendt, A.R., McDowall, A., Craig, A.G., Bates, P.A., Sternberg, M.J., Marsh, K., Newbold, C.I., and Hogg, N. 1992. The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell*. 68:71-81.
- Berrier, A.L., and Yamada, K.M. 2007. Cell-matrix adhesion. *Journal of cellular physiology*. 213:565-573.
- Blystone, S.D., Graham, I.L., Lindberg, F.P., and Brown, E.J. 1994. Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J Cell Biol*. 127:1129-1137.

- Boucheix, C., Duc, G.H., Jasmin, C., and Rubinstein, E. 2001. Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med.* 2001:1-17.
- Boucheix, C., Perrot, J.Y., Mirshahi, M., Giannoni, F., Billard, M., Bernadou, A., and Rosenfeld, C. 1985. A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research.* 9:597-604.
- Boucheix, C., and Rubinstein, E. 2001. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* 58:1189-1205.
- Calderwood, D.A. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci.* 117:657-666.
- Calderwood, D.A., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 275:22607-22610.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. 2003. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology.* 15:547-556.
- Carrasco, Y.R., Fleire, S.J., Cameron, T., Dustin, M.L., and Batista, F.D. 2004. LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity.* 20:589-599.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J., and Cybulsky, M.I. 2003. Detecting rapid and transient upregulation of leukocyte integrin affinity induced by chemokines and chemoattractants. *Journal of immunological methods.* 273:43-52.
- Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 2014. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci.* 127:3641-3648.
- Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 2001. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem.* 276:14329-14337.
- Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J.* 420:133-154.
- Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett.* 516:139-144.
- Chen, E.J., Shaffer, M.H., Williamson, E.K., Huang, Y., and Burkhardt, J.K. 2013. Ezrin and moesin are required for efficient T cell adhesion and homing to lymphoid organs. *PLoS One.* 8:e52368.
- Devbhandari, R.P., Shi, G.M., Ke, A.W., Wu, F.Z., Huang, X.Y., Wang, X.Y., Shi, Y.H., Ding, Z.B., Xu, Y., Dai, Z., Fan, J., and Zhou, J. 2011. Profiling of the tetraspanin CD151 web and conspiracy of CD151/integrin beta1 complex in the progression of hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 6:e24901.
- Dransfield, I., Cabañas, C., Barrett, J., and Hogg, N. 1992a. Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *J Cell Biol.* 116:1527-1535.
- Dransfield, I., Cabañas, C., Craig, A., and Hogg, N. 1992b. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol.* 116:219-226.
- Dupuy, A.G., and Caron, E. 2008. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *J Cell Sci.* 121:1773-1783.
- Dustin, M.L. 2008. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunological reviews.* 221:77-89.
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., and Hogg, N. 2009. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 122:215-225.
- Gahmberg, C.G., Valmu, L., Kotovuori, A., Kotovuori, P., Hilden, T.J., Fagerholm, S., Kantor, C., Nurminen, T., Ihanus, E., and Tian, L. 1999. Leukocyte adhesion--an integrated molecular process at the leukocyte plasma membrane. *Bioscience reports.* 19:273-281.
- García-España, A., Chung, P.J., Sarkar, I.N., Stiner, E., Sun, T.T., and Desalle, R. 2008. Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics.* 91:326-334.
- Gilsanz, A., Sánchez-Martín, L., Gutiérrez-López, M.D., Ovalle, S., Machado-Pineda, Y., Reyes, R., Swart, G.W., Figdor, C.G., Lafuente, E.M., and Cabañas, C. 2013.

- ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci.* 70:475-493.
- Gordon-Alonso, M., Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Alvarez, S., Muñoz-Fernández, M.A., Valenzuela-Fernández, A., and Sánchez-Madrid, F. 2006. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol.* 177:5129-5137.
- Gutiérrez-López, M.D., Gilsanz, A., Yáñez-Mó, M., Ovalle, S., Lafuente, E.M., Domínguez, C., Monk, P.N., González-Alvaro, I., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. 2011. The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci.* 68:3275-3292.
- Hammond, C., Denzin, L.K., Pan, M., Griffith, J.M., Geuze, H.J., and Cresswell, P. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol.* 161:3282-3291.
- Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. 2009. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 122:159-163.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., Han, J.H., Balfe, P., and McKeating, J.A. 2008. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *Journal of virology.* 82:5007-5020.
- Hemler, M.E. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:397-422.
- Hemler, M.E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 6:801-811.
- Hemler, M.E. 2008. Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 7:747-758.
- Hemler, M.E. 2014. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature reviews. Cancer.* 14:49-60.
- Higashiyama, M., Taki, T., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C.L., Koh, T., Kodama, K., Doi, O., and Miyake, M. 1995. Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer research.* 55:6040-6044.
- Ho, S.H., Martin, F., Higginbottom, A., Partridge, L.J., Parthasarathy, V., Moseley, G.W., Lopez, P., Cheng-Mayer, C., and Monk, P.N. 2006. Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology.* 80:6487-6496.
- Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K., and McDowall, A. 2003. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci.* 116:4695-4705.
- Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 1998. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem.* 273:30537-30543.
- Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ylanne, J., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. 1995. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem.* 270:12411-12417.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 119:3901-3903.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48:549-554.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Indig, F.E., Díaz-González, F., and Ginsberg, M.H. 1997. Analysis of the tetraspanin CD9-integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) complex in platelet membranes and transfected cells. *Biochem J.* 327 (Pt 1):291-298.
- Inui, S., Higashiyama, S., Hashimoto, K., Higashiyama, M., Yoshikawa, K., and Taniguchi, N. 1997. Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored

- heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *Journal of cellular physiology*. 171:291-298.
- Jankowski, S.A., Mitchell, D.S., Smith, S.H., Trent, J.M., and Meltzer, P.S.** 1994. SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene*. 9:1205-1211.
- Jones, P.H., Bishop, L.A., and Watt, F.M.** 1996. Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun*. 4:297-305.
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., and Kudo, A.** 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature genetics*. 24:279-282.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A.** 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*. 301:1720-1725.
- Kim, M., Carman, C.V., Yang, W., Salas, A., and Springer, T.A.** 2004. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *J Cell Biol*. 167:1241-1253.
- Kinashi, T.** 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*. 5:546-559.
- Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., and Bolognesi, M.** 2001. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J*. 20:12-18.
- Kovalenko, O.V., Yang, X., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E.** 2004. Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J*. 377:407-417.
- Kucik, D.F., Dustin, M.L., Miller, J.M., and Brown, E.J.** 1996. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest*. 97:2139-2144.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E.** 2006. Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics*. 6:6447-6454.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C.** 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*. 287:319-321.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., and Liddington, R.** 1995. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*. 80:631-638.
- Legate, K.R., Wickstrom, S.A., and Fassler, R.** 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & development*. 23:397-418.
- Levy, S., and Shoham, T.** 2005a. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology*. 20:218-224.
- Levy, S., and Shoham, T.** 2005b. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature reviews. Immunology*. 5:136-148.
- Little, K.D., Hemler, M.E., and Stipp, C.S.** 2004. Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell*. 15:2375-2387.
- Liu, S., Calderwood, D.A., and Ginsberg, M.H.** 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*. 113 (Pt 20):3563-3571.
- Longhurst, C.M., White, M.M., Wilkinson, D.A., and Jennings, L.K.** 1999. A CD9, alphaIIb beta3, integrin-associated protein, and GPIb/V/IX complex on the surface of human platelets is influenced by alphaIIb beta3 conformational states. *Eur J Biochem*. 263:104-111.
- Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E.** 2000. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol*. 30:900-907.
- Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A.** 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*. 25:619-647.

- Miao, W.M., Vasile, E., Lane, W.S., and Lawler, J. 2001. CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood*. 97:1689-1696.
- Mittelbrunn, M., Martínez del Hoyo, G., López-Bravo, M., Martín-Cofreces, N.B., Scholer, A., Hugues, S., Fetler, L., Amigorena, S., Ardavin, C., and Sánchez-Madrid, F. 2009. Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood*. 113:75-84.
- Miyake, M., Koyama, M., Seno, M., and Ikeyama, S. 1991. Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility. *J Exp Med*. 174:1347-1354.
- Miyake, M., Nakano, K., Itoi, S.I., Koh, T., and Taki, T. 1996. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer research*. 56:1244-1249.
- Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Haraguchi, M., Ueo, H., Barnard, G.F., and Akiyoshi, T. 1998. Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 4:1507-1510.
- Morse, E.M., Brahme, N.N., and Calderwood, D.A. 2014. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*. 53:810-820.
- Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., and Fassler, R. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*. 324:895-899.
- Nakamura, K., Iwamoto, R., and Mekada, E. 1995. Membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27)/CD9 form a complex with integrin alpha 3 beta 1 at cell-cell contact sites. *J Cell Biol*. 129:1691-1705.
- Niu, G., and Chen, X. 2011. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics*. 1:30-47.
- Ono, M., Handa, K., Withers, D.A., and Hakomori, S. 2000. Glycosylation effect on membrane domain (GEM) involved in cell adhesion and motility: a preliminary note on functional alpha3, alpha5-CD82 glycosylation complex in Id1D 14 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 279:744-750.
- Ostermann, G., Weber, K.S., Zerneck, A., Schroder, A., and Weber, C. 2002. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature immunology*. 3:151-158.
- Ovalle, S., Gutiérrez-López, M.D., Olmo, N., Turnay, J., Lizarbe, M.A., Majano, P., Molina-Jimenez, F., López-Cabrera, M., Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. 2007. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 121:2140-2152.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*. 275:21785-21788.
- Porter, J.C., and Hogg, N. 1997. Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function. *J Cell Biol*. 138:1437-1447.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 183:1161-1172.
- Robertson, M.J., Caligiuri, M.A., Manley, T.J., Levine, H., and Ritz, J. 1990. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis. *J Immunol*. 145:3194-3201.
- Rocha-Perugini, V., González-Granado, J.M., Tejera, E., López-Martín, S., Yáñez-Mó, M., and Sánchez-Madrid, F. 2014. Tetraspanins CD9 and CD151 at the immune synapse support T-cell integrin signaling. *Eur J Immunol*. 44:1967-1975.
- Rodríguez-Fernández, J.L., Sánchez-Martin, L., Rey, M., Vicente-Manzanares, M., Narumiya, S., Teixido, J., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. 2001. Rho and

- Rho-associated kinase modulate the tyrosine kinase PYK2 in T-cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J Biol Chem.* 276:40518-40527.
- Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A., Gray, S.R., Stephens, D.J., Banting, G., and Luzio, J.P. 2002. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell.* 13:1071-1082.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M., and Boucheix, C. 1994. CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur J Immunol.* 24:3005-3013.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H., and Boucheix, C. 1996. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol.* 26:2657-2665.
- Sala-Valdés, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M.E., Sánchez-Madrid, F., and Yáñez-Mó, M. 2006. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem.* 281:19665-19675.
- Salas, A., Shimaoka, M., Kogan, A.N., Harwood, C., von Andrian, U.H., and Springer, T.A. 2004. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity.* 20:393-406.
- Sánchez-Mateos, P., Cabañas, C., and Sánchez-Madrid, F. 1996. Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol.* 7:99-109.
- Scherberich, A., Moog, S., Haan-Archipoff, G., Azorsa, D.O., Lanza, F., and Beretz, A. 1998. Tetraspanin CD9 is associated with very late-acting integrins in human vascular smooth muscle cells and modulates collagen matrix reorganization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1691-1697.
- Schmidt, D.S., Klingbeil, P., Schnolzer, M., and Zoller, M. 2004. CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res.* 297:329-347.
- Seehafer, J.G., Tang, S.C., Slupsky, J.R., and Shaw, A.R. 1988. The functional glycoprotein CD9 is variably acylated: localization of the variably acylated region to a membrane-associated peptide containing the binding site for the agonistic monoclonal antibody 50H.19. *Biochim Biophys Acta.* 957:399-410.
- Serru, V., Dessen, P., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 2000. Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochim Biophys Acta.* 1478:159-163.
- Shaw, A.R., Domanska, A., Mak, A., Gilchrist, A., Dobler, K., Visser, L., Poppema, S., Fliegel, L., Letarte, M., and Willett, B.J. 1995. Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 270:24092-24099.
- Sheppard, D. 2000. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 19:203-209.
- Shi, W., Fan, H., Shum, L., and Derynck, R. 2000. The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol.* 148:591-602.
- Shibagaki, N., Hanada, K., Yamashita, H., Shimada, S., and Hamada, H. 1999. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1 / ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur J Immunol.* 29:4081-4091.
- Si, Z., and Hersey, P. 1993. Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 54:37-43.
- Sincock, P.M., Fitter, S., Parton, R.G., Berndt, M.C., Gamble, J.R., and Ashman, L.K. 1999. PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J Cell Sci.* 112 (Pt 6):833-844.
- Slupsky, J.R., Seehafer, J.G., Tang, S.C., Masellis-Smith, A., and Shaw, A.R. 1989. Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association

- between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* 264:12289-12293.
- Springer, T.A.** 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:65-72.
- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., and Marlin, S.D.** 1987. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annual review of immunology.* 5:223-252.
- Staunton, D.E., Lupper, M.L., Liddington, R., and Gallatin, W.M.** 2006. Targeting integrin structure and function in disease. *Advances in immunology.* 91:111-157.
- Stewart, M., and Hogg, N.** 1996. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *Journal of cellular biochemistry.* 61:554-561.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E.** 2001. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem.* 276:40545-40554.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E.** 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* 28:106-112.
- Sun, T.T., Zhao, H., Provet, J., Aebi, U., and Wu, X.R.** 1996. Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation. *Mol Biol Rep.* 23:3-11.
- Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., and Linnenbach, A.J.** 1990. Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6833-6837.
- Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., Kimura, H., Yamane, H., Saito, Y., Goto, H., Yoneda, T., Yoshida, M., Kumagai, T., Osaki, T., Hayashi, S., Kawase, I., and Mekada, E.** 2003. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J Cell Biol.* 161:945-956.
- Tarrant, J.M., Robb, L., van Spriel, A.B., and Wright, M.D.** 2003. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol.* 24:610-617.
- Todd, S.C., Doctor, V.S., and Levy, S.** 1998. Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochim Biophys Acta.* 1399:101-104.
- Toyo-oka, K., Yashiro-Ohtani, Y., Park, C.S., Tai, X.G., Miyake, K., Hamaoka, T., and Fujiwara, H.** 1999. Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *International immunology.* 11:2043-2052.
- van Kooyk, Y., and Figdor, C.G.** 2000. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Current opinion in cell biology.* 12:542-547.
- van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, E., Weder, P., Huijbens, R.J., and Figdor, C.G.** 1993. Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. *J Exp Med.* 177:185-190.
- van Kooyk, Y., van Vliet, S.J., and Figdor, C.G.** 1999. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem.* 274:26869-26877.
- van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P.T., Bleeker-Wagemakers, E.M., and Bergen, A.A.** 1999. Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol.* 43:321-334.
- VanCompernelle, S.E., Levy, S., and Todd, S.C.** 2001. Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell-B cell collaboration. *Eur J Immunol.* 31:823-831.
- Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R.** 2011. Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci.* 124:3923-3927.
- Weber, C., Lu, C.F., Casasnovas, J.M., and Springer, T.A.** 1997. Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. *J Immunol.* 159:3968-3975.
- Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Wang, Z., Kreidberg, J.A., and Hemler, M.E.** 2002. Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral

- interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell*. 13:767-781.
- Yang, X., Kovalenko, O.V., Tang, W., Claas, C., Stipp, C.S., and Hemler, M.E.** 2004. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J Cell Biol*. 167:1231-1240.
- Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., and Sánchez-Madrid, F.** 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol*. 19:434-446.
- Yáñez-Mó, M., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F.** 2001. Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation*. 8:153-168.
- Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C.** 2011. Membrane proteases and tetraspanins. *Biochemical Society transactions*. 39:541-546.
- Yauch, R.L., and Hemler, M.E.** 2000. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J*. 351 Pt 3:629-637.
- Zhang, X.A., Bontrager, A.L., and Hemler, M.E.** 2001a. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem*. 276:25005-25013.
- Zhang, X.A., Bontrager, A.L., Stipp, C.S., Kraeft, S.K., Bazzoni, G., Chen, L.B., and Hemler, M.E.** 2001b. Phosphorylation of a conserved integrin alpha 3 QPSXXE motif regulates signaling, motility, and cytoskeletal engagement. *Mol Biol Cell*. 12:351-365.
- Zhu, G.Z., Miller, B.J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C.C., Hynes, R.O., Myles, D.G., and Primakoff, P.** 2002. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development*. 129:1995-2002.

A decorative horizontal border with a scroll-like design on the left and right ends, enclosing the text.

PUBLICACIONES

Lista de artículos publicados durante el desarrollo de esta Tesis

1. **Reyes R**, Monjas A, Yáñez-Mó M, Cardenes B, Morlino G, Gilsanz A, Machado Y, Lafuente E, Monk P, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. (2015). Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9. **Biochimica et Biophysica Acta. 1853:** 2464-80.
2. Sandoval P, Jiménez-Heffernan JA, Rynne-Vidal A, Pérez-Lozano ML, Gilsanz A, Ruiz-Carpio V, **Reyes R**, García-Bordas J, Stamatakis K, Dotor J, Majano PL, Fresno M, Cabañas C, López-Cabrera M. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial to mesenchymal transition in peritoneal metastasis. **Journal of Pathology. 231:** 517-531.
3. Medraño-Fernandez I, **Reyes R**, Olazabal I, Rodríguez E, Sánchez-Madrid F, Boussiotis VA, Reche, P, Cabañas C, Lafuente EM. RIAM regulates complement-dependent phagocytosis. (2013). **Cellular and Molecular Life Sciences. 70:** 2395-410.
4. Gilsanz A, Sánchez-Martín L, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Machado-Pineda Y, **Reyes R**, Swart GW, Figdor CG, Lafuente EM, Cabañas C. (2013). ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. **Cellular and Molecular Life Sciences. 70:** 475-93.

